Aus der Biochemischen Abteilung des Diabetes Forschungsinstituts
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Hans Reinauer

Bestimmung von Blei im Vollblut und Mangan im Serum durch flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie bei Diabetikern und Normalpersonen

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Werner Fleischhauer

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0072

Aus der Biochemischen Abteilung des Diabetes
Forschungsinstituts an der Universität Düsseldorf

Direktor : Prof. Dr. Hans Reinauer

Bestimmung von Blei im Vollblut und Mangan im Serum durch flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie bei Diabetikern und Normalpersonen

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf vorgelegt von

Werner Fleischhauer

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. : Prof. Dr. Arnold

Referent

gez. : Prof. Dr. Reinauer

Korreferent

gez. : Prof. Dr. Ohnesorge

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Blei	1
1.1.1.	Stoffwechsel und Toxizität des organischen Blei	1
1.1.2.	Stoffwechsel und Toxizität des anorganischen Blei	1
1.2.	Mangan	4
1.2.1.	Stoffwechsel von Mangan	4
1.2.2.	Toxizität des Mangan	5
1.2.3.	Mangan als essentielles Spurenelement, Manganmangel im Tierexperiment	5
1.3.	Fragestellung	7
1.4.	Analytisches Ziel	8
2.	Analyse	9
2.1.	Prinzip der AAS (Atomabsorptionsspektroskopie)	9
2.2.	Instrumentarium	10
2.2.1.	Lichtquelle	11
2.2.2.	Atomreservoir (Graphitrohrküvette)	12
2.2.3.	Detektor und Meßwertanzeige	12
2.3.	Untergrundkompensation	13
2.3.1.	Untergrundkompensation mit Deuteriumlampe	13
2.3.2.	Untergrundkompensation durch Zeeman-Effekt	14
2.4.	Messung von Blei im Vollblut	18
2.4.1.	Probensammlung und Lagerung	18
2.4.2.	Kontaminationskontrolle	18
2.4.3.	Auswahl der geeigneten Geräteparameter	20
2.4.3.1.	Küvetten und Probevolumen	20
2.4.3.2.	Wellenlänge, Spalt und Aufzeichnungsbedingungen	24
2.4.3.3.	Temperaturprogramm und Gaseinstellung	25
2.4.3.4.	Probenaufbereitung und Eichung	31

2.4.3.5.	Wiederfindung und Präzision	37
2.5.	Messung von Mangan im Serum	41
2.5.1.	Probensammlung und Lagerung	41
2.5.2.	Kontaminationskontrolle	41
2.5.3.	Geräteparameter	42
2.5.3.1	Küvetten und Probevolumen	42
2.5.3.2.	Wellenlänge,Spalt und Aufzeichnungsbedingungen	43
2.5.3.3.	Temperaturprogramm und Gaseinstellung	44
2.5.3.4.	Probenaufbereitung und Eichung	48
2.5.3.5.	Wiederfindung und Präzision	52
3.	Ergebnisse	56
3.1.	Blei	56
3.2.	Mangan	61
4.	Diskussion	66
4.1.	Probensammlung und Lagerung	66
4.2.	Kontamination	66
4.3.	Matrix	68
4.4.	Gerät	69
4.5.	Wiederfindung, Präzision und Vergleichsmessung mit einem anderen Labor	71
4.6.	Vergleich mit Literaturwerten	76
4.7.	Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen	79
5.	Zusammenfassung	80
6.	Literaturverzeichnis	81

1. Einleitung

Das Ziel dieser Arbeit ist die routinemäßige Analyse der Metalle Blei und Mangan in Vollblut bzw. Serum von Patienten und Probanden. Zunächst eine kurze Einführung in den Stoffwechsel und die biologischen Effekte dieser Elemente.

1.1. Blei

Blei ist ein ausschließlich toxisches Element. Es sind keine physiologischen Vorgänge beschrieben, an denen das Blei beteiligt wäre. Bezüglich Stoffwechsel und Toxizität muß man zwischen organischem und anorganischem Blei unterscheiden.

1.1.1. Stoffwechsel und Toxizität von organischem Blei

Das organische, lipophile Tetraäthylblei wird durch Inhalation und Resorption durch die Haut aufgenommen. In der Leber wird es zum eigentlich toxischen Triäthylblei dealkyliert (1). Dies wird im Gehirn und Fettgewebe angereichert und führt u.a. zu Vergiftungssymptomen von Seiten des ZNS; im akuten Verlauf zu psychomotorischen Erregungszuständen, epileptischen Krämpfen und deliranten Krisen (2). Bei chronischem Verlauf kann es zu Spätsymptomen wie Lähmungen und Parkinsonismus kommen (3).

1.1.2. Stoffwechsel und Toxizität des anorganischen Blei

Das anorganische Blei wird über den Respirations- und den Gastrointestinaltrakt aufgenommen. In allen Teilen des Respirationstrakts wird das Blei resorbiert, während im Gastrointestinaltrakt in erster Linie das Ileum, aber auch das Colon Blei re-

UNIV. LEIDEN BIBL.

sorbieren. Nur 10 % des oral zugeführten Blei wird resorbiert, der Rest wird mit den Faeces wieder ausgeschieden (4). Im Blut wird das Blei zu 95 % an die Erythrozyten gebunden (5). Die Verteilung von Blei im Körper zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Bleikonzentrationen in Organen (modifiziert nach 5)

Organ	Bleikonzentration (in mg/kg Frischgewicht)
Niere	0,5
Leber	1,2
Muskel	0,3
Lunge	0,3
Gehirn	0,4
Knochen	1,2

Das meiste Blei befindet sich also in den Knochen. Der Bleigehalt dieser Knochenspeicher steigt mit zunehmendem Lebensalter, während der Bleigehalt der anderen Gewebe nur bis zum Erwachsenenalter ansteigt, um dann konstant zu bleiben (6). Vitamin D, Parathormon, Azidose, Diätfehler, katabole Steroide, Infekte und auch physische Belastung führen zu einer Mobilisierung des Blei aus seinen Depots (3;4). Die Ausscheidung erfolgt zu ca. 76 % mit dem Harn, zu ca. 16 % durch den Gastrointestinaltrakt und ca. 8 % gehen durch Schweiß und ähnliches verloren (6).
Blei verbindet sich mit den Sulfhydrylgruppen von Proteinen und hemmt auf diese Weise Enzyme. Besonders gravierend sind die Enzymhemmungen durch Blei bei der Hämatopoese (Tab. 2).

Tabelle 2: Hemmung der Hämsynthese durch Blei (mod. nach 5)

Syntheseschritte	sich anhäufende intermediäre Stoffwechselprodukte	Körperflüssigkeiten, in denen die Erhöhung nachweisbar ist
δ-Aminolävulinsäure	δ-Aminolävulinsäure	Harn und Blut
Blei ⊣ ↓		
Porphobilinogen		
↓		
Uroporphyrinogen III		
↓		
Koproporphyrinogen III	Koproporphyrinogen III	Harn und Blut
Blei ⊣ ↓		
Protoporphyrinogen IX		
↓		
Protoporphyrin IX	Protoporphyrin IX	Blut
Blei ⊣ ↓ ← Fe		
Häm		

Durch diese Schädigung kommt es zu einer typischen hypochromen Anämie mit basophiler Tüpfelung. Kennzeichnend für die Bleiintoxikation ist auch die Porphyrinurie mit charakteristischen Begleitsymptomen.

Am ZNS führt die Bleivergiftung zu Apathie, Rastlosigkeit, Kopfschmerzen, Tremor und Halluzinationen. Die Symptome können sich steigern bis zu Delirien, Krämpfen, Paralyse und Koma. Das kindliche Hirn ist besonders anfällig gegenüber der Noxe Blei. Die durch Blei hervorgerufene Polyneuropathie betrifft in erster Linie den motorischen Teil des peripheren NS. Am Gastrointestinaltrakt kommt es besonders bei akuter Vergiftung zu Porphyrien (6). Ferner soll es durch Blei zur Ausbildung einer Schrumpfniere kommen (2).
Toxische Effekte des Blei auf den Kohlenhydratstoffwechsel sind in der Literatur bisher nicht beschrieben.

1.2. Mangan

Mangan hat im Organismus essentielle Bedeutung als Cofaktor von Enzymen, führt aber in hoher Konzentration auch zu Vergiftungen.

1.2.1. Stoffwechsel von Mangan

Mangan wird ähnlich wie Blei vom Gastrointestinaltrakt und über die Lunge resorbiert. Tierexperimentielle Untersuchungen haben eine Resorptionsquote von oral zugeführtem Mangan von 4 % ergeben (7). Im Serum ist Mangan an ein β_1 Globulin gebunden (8;9). Mangan reichert sich vor allem in den Mitochondrien an. Daher haben mitochondrienreiche Organe einen besonders hohen Mangan-Gehalt (Tab. 3).

Die Ausscheidung von Mangan erfolgt vornehmlich durch den Gastrointestinaltrakt, wobei der Großteil von Mangan mit der Galle abgegeben wird. Im Harn erscheinen nur geringe Mengen Mangan (7).

Tabelle 3: Mangangehalte verschiedener Organe des Menschen (modifiziert nach 7)

Organ	Mangan Konzentration (in mg/l des frischen Organs)
Gehirn	0,34
Herz	0,23
Niere	0,93
Leber	1,68
Lunge	0,34
Muskel	0,09
Pankreas	1,21

1.2.2. Toxizität des Mangan

Durch massive Inhalation kann es zu toxischen Erscheinungen durch Mangan kommen. Beschrieben sind ein Parkinsonsyndrom (10) und eine manganbedingte Form der Lobärpneumonie (7).

1.2.3. Mangan als essentielles Spurenelement, Manganmangel im Tierexperiment

Mangan ist ein wichtiger Cofaktor bei mehreren Enzymen und daher ein essentielles Spurenelement. Beim Menschen ist erst ein Fall von Manganmangel beschrieben worden: Bei diesem Patienten wurde ein verlangsamtes Wachstum von Haaren und Nägeln sowie ein Gewichtsverlust beobachtet (29).

Im Tierexperiment kommt es bei den Nachkommen manganarm ernährter Ratten und Schweine zu einer durch Schädigung des Innenohrs hervorgerufenen Ataxie. An Ratten wurde auch die Störung von Ovulation und Spermatogenese im Manganmangel festgestellt (8). Ferner kommt es unter Manganmangelernährung zu Deformierungen und Wachstumsstörungen des Skeletts. Das pathogenetische Agens ist dabei ein Defekt im Proteoglykanstoffwechsel des Knorpels. Dieser Defekt wird hervorgerufen durch eine Störung der manganabhängigen Polymerase, die die Polymerisation von UDP-N-Acetyl-Galaktosamin und UDP-Glucuronat katalysiert, und der Galaktotransferase, die Galaktose aus UDP-Galaktose in ein aus zwei Galaktose und einem Xyloserest bestehendes Trisaccharid einbaut, das die Verbindung zwischen Protein und Polysaccharidanteil herstellt (11). Im Fettstoffwechsel soll Mangan bei der Umwandlung von Mevalonat zu Mevalonat-5-Phosphat durch die Mevalonat-Kinase ein notwendiger Cofaktor sein (8). Auch die Aktivität der Arginase, die als Schrittmacherenzym des Harnstoffzyklus eine wichtige Rolle spielt, ist im Manganmangel erniedrigt (7;12).
Im Kohlenhydratstoffwechsel ist das Enzym der Gluconeogenese Pyruvatcarboxylose, das die Umwandlung von Pyruvat und CO_2 zu Oxalacetat katalysiert, ein manganabhängiges Metalloenzym. Die Notwendigkeit des Mangan für den Kohlenhydratstoffwechsel wird auch durch Versuche an Schweinen mit Manganmangel bestätigt. Diese Schweine weisen eine verminderte Glucosetoleranz auf, die durch manganhaltige Ernährung wieder normalisiert werden kann. An diesen manganmangelernährten Schweinen ist eine herabgesetzte Zahl von ß-Zellen und Langerhans´schen In-

seln festgestellt worden (7). Weitere Zusammenhänge zwischen Mangan und dem Kohlenhydratstoffwechsel zeigen Versuche am isolierten Kaninchenpankreas: Hier wirkt Mangan einerseits in Anwesenheit von Calcium hemmend auf die Sekretion von Insulin und Glukagon, andererseits in Abwesenheit von Calcium aktivierend auf die Inkretion beider Hormone (13).

1.3. Fragestellung

Diese engen Zusammenhänge zwischen dem Element Mangan und dem Kohlenhydratstoffwechsel werfen die Frage auf, ob die Mangankonzentration im Serum von Diabetikern verändert ist. Das Mangan wird im Serum bestimmt, da es im Blut an ein ß-Globulin gebunden transportiert wird.
Während beim Mangan die Verbindung zum Kohlenhydratstoffwechsel deutlich ist, sind beim Blei solche Beziehungen nicht beschrieben. Doch bei den multiplen Schädigungen, die das Blei hervorruft, sollte untersucht werden, ob Blei nicht auch in der Pathogenese des Diabetes eine Rolle spielt. Dazu wird der Bleigehalt im Blut von Diabetikern und Normalpersonen bestimmt und verglichen. Hier ist die Bestimmung im Vollblut durchzuführen, da sich fast das gesamte Blutblei in den Erythrozyten befindet.
Um auch Unterschiede zwischen dem Diabetes Typ I und II, sowie gut und schlecht eingestellten Diabetikern herausarbeiten zu können, werden die untersuchten Personen 5 Kollektiven zugeordnet:

1. gut eingestellte Diabetiker Typ I
2. schlecht eingestellte Diabetiker Typ I
3. gut eingestellte Diabetiker Typ II
4. schlecht eingestellte Diabetiker Typ II
5. Normalpersonen

Von jedem Patienten wird außerdem ein Dokumentationsbogen angelegt, in dem unter anderem folgende Daten festgehalten werden:

1. Probennummer
2. Name und Adresse des Patienten
3. Name und Adresse des Hausarztes
4. Typ, Dauer und Medikation des Diabetes
5. Art, Kalorienzahl und Zusammensetzung der Diät
6. Diabetische Folgeerkrankungen
7. vom Diabetes unabhängige Erkrankungen
8. andere dem Patienten verordnete Medikamente
9. Umweltbelastung am Wohnort und Arbeitsplatz
10. Laborwerte

Diese Dokumentation soll helfen, Störgrößen, wie z.B. Bleibelastung am Arbeitsplatz, zu erkennen und zu eliminieren, so daß es nicht zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommt.

1.4. Analytisches Ziel

Es soll eine möglichst einfache Methode zur Bestimmung von Mangan im Serum und Blei im Vollblut erarbeitet werden, die in einem klinisch-chemischen Labor durchgeführt werden kann. Es steht hierzu ein Atomabsorptionsspektrophotometer vom Typ Hitachi 170-70 zur Verfügung. Die Validität der Analyse wird durch Wiederfindungsberechnungen bzw. durch Vergleichsmessungen mit einem anderen Labor überprüft.

2. Analyse

2.1. Prinzip der AAS
(=Atomabsorptionsspektrophotometrie) (14)

Bei der AAS wird das zu bestimmende Element durch hohe Temperaturen in Atomdampf überführt. Jedes Element absorbiert in diesem Zustand Licht bei elementspezifischen Wellenlängen (=Emissionslinien des Elements). Strahlt man Licht dieser elementspezifischen Wellenlängen durch den Atomdampf, so wird dieses Licht absorbiert. Das geschieht durch den Übergang der Bahnelektronen der Atome vom Grundzustand E_o in den angeregten Zustand E. Dabei tritt eine Schwächung der Lichtintensität I ein. War die Lichtintensität vor Eintritt in den Atomdampf $I_{o\lambda}$, so reduziert sie sich nach Durchtritt auf I_λ.

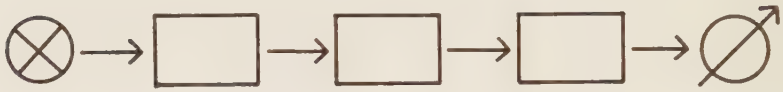
Die vom Atomdampf aufgenommene Energie ΔE ist genauso groß wie die durch Schwächung der Lichtintensität verloren gegangene Energie.
Die Schwächung der Lichtintensität auf der Emissionslinie des zu bestimmenden Elements wird als Extinktion

$$E = \log \frac{I_o}{I}$$

gemessen. Dabei ist die Extinktion ein Maß für die Atomdampfkonzentration.

2.2. Instrumentarium

Das benötigte Instrumentarium ist im folgenden Blockschaltbild dargestellt:



L A M D R

L = Lichtquelle
A = Atomreservoir
M = Monochromator
D = Detektor
R = Meßwertanzeige

Abbildung 1: Blockschaltbild eines Atomabsorptionsspektrophotometers

Die Lichtquelle L emittiert Licht verschiedener Atomlinien mit der Intensität $I_{o\lambda n}$. Dieses Licht wird im Atomreservoir A teilweise absorbiert; es resultiert die abgeschwächte Lichtintensität $I_{\lambda n}$. Der Monochromator M selektiert anschließend die gewünschte Wellenlänge aus der vom Atomreservoir kommenden, meist polychromatischen Linienstrahlung ($I_{\lambda n} \longrightarrow I_{\lambda}$). Im Detektor D wird die Abschwächung der Lichtintensität gemessen und in ein Meßsignal umgewandelt, das durch die Meßwertanzeige R angezeigt wird.

2.2.1. Lichtquelle

Als Lichtquellen werden Hohlkathodenlampen verwendet. Sie senden ein Atomlinienemissionsspektrum aus. Ein wesentlicher Parameter ist die Lampenstromstärke. Wählt man diese zu groß, so kommt es zur Verbreiterung und Einsattelung der ausgesandten Emissionslinien (Abb. 2) und zu einer herabgesetzten Lebensdauer der Lampe.

Ist die Stromstärke zu niedrig, so verschlechtert sich wegen der verringerten Emissionsintensität das Signal/Rausch Verhältnis.

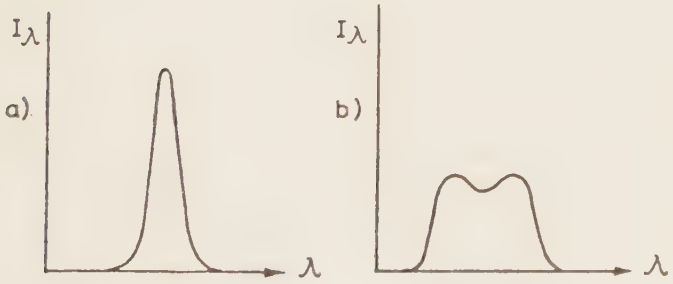


Abbildung 2: Emissionslinie einer Hohlkathodenlampe mit normaler (a) und überhöhter (b) Betriebsstromstärke (14)

2.2.2. Atomreservoir (Graphitrohrküvette)

Man unterscheidet zwischen Methoden in der Flamme und flammenlosen Methoden. Bei Analysen in der Flamme kommt die Probe als Lösung über den Brenner in die Flamme und wird dort atomisiert.
Mit der flammenlosen Analyse ist eine günstigere Nachweisgrenze zu erzielen als mit der Flamme. Das hängt u.a. auch mit der längeren Verweilzeit des Einzelatoms in der Küvette zusammen. Die am häufigsten verwendete Technik, nach der auch das Gerät Hitachi 170-70 arbeitet, ist die Analyse im Graphitrohrofen. Es wird ein elektrischer Strom hoher Stromstärke durch den Graphitrohrofen geleitet und der Ofen dadurch erhitzt. Die Probe wird im Ofen verdampft und thermisch atomisiert. Eine Hohlkathodenlampenstrahlung wird durch den Graphitrohrofen geschickt und durch den Atomdampf entsprechend seiner Konzentration in ihrer Lichtintensität geschwächt.

2.2.3. Detektor und Meßwertanzeige

Der Detektor wandelt die Intensität des Lichtstrahls in einen linear proportionalen elektrischen Strom. Dabei werden Elektronen durch Auftreffen von Photonen auf einer Photoelektrode freigesetzt und diese wenigen primär freigesetzten Elektronen durch einen Sekundärelektronenvervielfacher bis zum Faktor 10^{10} verstärkt. Dieses der Lichtstärke proportionale Meßsignal wird dem Anzeigegerät zugeleitet. Für quantitative Analysen werden Geräte verwendet, die dann die Extinktion

$$E = \log \frac{I_o}{I}$$ anzeigen.

Für die Extinktion E gilt in einem bestimmten Konzentrationsbereich das modifizierte Lembert-Beersche Gesetz:

$$E = \epsilon \; l \; c \; f$$

ϵ = dekadischer Extinktionskoeffizient
l = Atomreservoirlänge
c = Atomdampfkonzentration
f = Wirkungsgrad des gesamten Atomisierungsprozesses

Wegen der Proportionalität von Extinktion E und Atomdampfkonzentration c läßt sich die Konzentration durch Eichverfahren einfach bestimmen.

2.3.1. Untergrundkompensation mit Deuteriumlampe

Das Atomlinienspektrum der Hohlkathodenlampe wird nicht nur spezifisch durch die Atome des zu messenden Elements, sondern auch unspezifisch durch den Untergrund geschwächt. Um dies zu kompensieren, verwendet man üblicherweise eine Deuteriumlampe mit einer Kontinuumstrahlung des gleichen Spektralbereichs und gleicher Strahlungsintensität wie die Hohlkathodenlampe, die ebenfalls den Atomdampf durchstrahlt. Während die Strahlung der Hohlkathodenlampe durch den Untergrund und vor allem die Atome des zu messenden Elements geschwächt wird, wird die Strahlung der Deuteriumlampe kaum durch die zu messenden Atome aber ungefähr gleich stark durch den Untergrund absorbiert. Bildet man zwischen beiden Absorptionen die Differenz, so eliminiert man weitgehend den Einfluß der Untergrundabsorption und erhält ungefähr die spezifische Absorption der zu bestimmenden Atome. Da es sich aber um zwei verschiedene Lichtquellen und unterschiedliche Wellenlängen handelt, ist diese Methode sehr problematisch.

2.3.2. Untergrundkompensation durch Zeeman-Effekt

Das AAS-Gerät Hitachi 170-70 kompensiert den Untergrund nach dem Prinzip der Zeeman-Effektes: Bringt man Atomdampf in ein Magnetfeld, so verändert sich die Absorptionslinie. Sie wird in drei unterschiedliche Wellenlängen (σ^- π σ^+), die jeweils nur das Licht der zur Wellenlänge gehörenden Polarisationsebene absorbieren, aufgespaltet. Die σ-Linien absorbieren nur senkrecht zum Magnetfeld einfallendes Licht, während die π-Linie ausschließlich parallel zum Magnetfeld einfallendes Licht absorbiert.
Polarisiert man den Lichtstrahl der Hohlkathodenlampe mit der Wellenlänge π in einen senkrecht und einem parallel zum Magnetfeld verlaufenden Strahl, so haben wir zwei Strahlen völlig identischer Wellenlänge und Lichtintensität. Der eine ist parallel zum Magnetfeld polarisiert und hat die Wellenlänge π , der andere hat ebenfalls die Wellenlänge π, ist aber senkrecht zum Magnetfeld polarisiert.

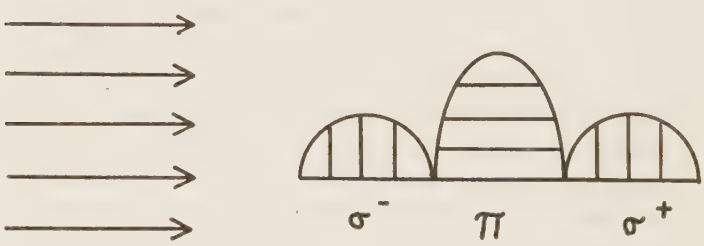


Abbildung 3: Absorptionsbanden bei Zeeman-Effekt

Der parallel polarisierte Strahl wird von den Atomen des zu bestimmenden Elements absorbiert, da er die π-Wellenlänge besitzt und parallel zum Magnetfeld polarisiert ist. Außerdem wird er unspezifisch durch den Untergrund geschwächt (Abb. 3). Der senkrecht zum Magnetfeld polarisierte Strahl hat zwar die Wellenlänge π, wird aber vom Atomdampf nicht absorbiert, da dieser bei der Wellenlänge π ausschließlich parallel verlaufendes Licht absorbiert. Senkrechtes Licht würde bei den von π verschiedenen Wellenlängen σ^- und σ^+ absorbiert. Der senkrechte Strahl wird also ausschließlich vom Untergrund unspezifisch geschwächt (Abb. 4).

Da der senkrechte und der parallele Strahl gleiche Wellenlänge und Lichtintensität besitzen und sich nur durch die Polarisationsebene unterscheiden, ist ihre jeweilige unspezifische Schwächung durch den Untergrund absolut identisch. Subtrahiert man nun die Extinktion des ausschließlich durch den Untergrund geschwächten senkrechten Strahls von der des durch Atomdampf und Untergrund geschwächten parallelen Strahls, so erhält man die allein durch die zu bestimmenden Atome hervorgerufenen Extinktion (Abb. 5).

Der große Vorteil bei dieser Methode liegt darin, daß Meßstrahl (der parallele) und Kompensationsstrahl (der senkrechte) bis auf die Polarisationsebene absolut identisch sind und daher wirklich exakt gleich stark vom Untergrund geschwächt werden.

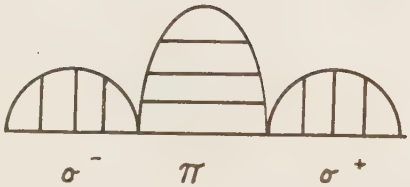
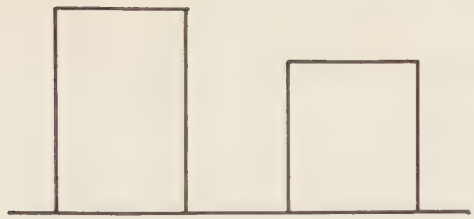
Magnetfeld	Absorptionsbande bei Zeeman-Effekt	Polarisierter Lichtstrahl	Absorptionsverhalten
			Der parallele Lichtstrahl stimmt in Polarisationsebene (parallel) und Wellenlänge (π) mit der Absorptionsbande überein. ABSORPTION
			Der senkrechte Lichtstrahl stimmt nur in der Wellenlänge (π), nicht aber in der Polarisationsebene (senkrecht) mit der Absorptionsebene überein. KEINE ABSORPTION

Abbildung 4: Absorption eines polarisierten Lichtstrahls bei Zeeman-Effekt



Extinktion
paralleler
Strahl

Atomdampf
(spezifisch)

Untergrund
(unspezifisch)

Extinktion
senkrechter
Strahl

Untergrund
(unspezifisch)

Subtraktion
beider
Extinktionen

Atomdampf
(spezifisch)

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Berechnung der spezifischen Atomdampfextinktion bei Untergrundkompensation durch Zeeman-Effekt

2.4. Messung von Blei im Vollblut

2.4.1. Probensammlung und Lagerung

Man punktiert mit einer Stahlkanüle eine Armvene des Patienten und entnimmt ihm ca. 40 ml Blut. Davon werden ca. 3 ml in ein Röhrchen, das EDTA enthält, gefüllt. Entweder wird diese Probe jetzt direkt analysiert, oder sie wird im Tiefkühlfach bei - 40 ^{o} C gelagert. Die unter dieser Lagerung eintretende Hämolyse stört nicht, und es ist mehrfach überprüft worden, daß auch bei langer Lagerzeit von einem Jahr keine Veränderungen der Blutbleikonzentrationen eintreten.

2.4.2. Kontaminationskontrolle

Eine Kontamination, d.h. in diesem Fall eine Verunreinigung durch Blei, ist prinzipiell auf drei Wegen möglich: Durch Gegenstände, mit denen die Probe in Berührung kommt, durch Reagentien und durch die Luft (15).
Die Blutprobe, deren Bleigehalt bestimmt wird, kommt mit folgenden Gegenständen in Kontakt: Stahlkanüle, Spritze, EDTA-Röhrchen, Pipettenspitzen und Polystyrolröhrchen, in denen die Probe für die Messung aufbereitet wird. Eine mögliche Bleikontamination wird folgendermaßen geprüft: Stahlkanüle, Plastikspritze und Pipettenspitze werden mit einer 10 mmol HCl-Lösung gespült, und die Spülflüssigkeit wird dann auf Bleikontamination hin untersucht. Das Polystyrol- und das EDTA-Röhrchen werden ebenfalls mit 10 mmol HCl-Lösung gefüllt und dann 24 Stunden stehengelassen. Danach wird diese HCl-Lösung hinsichtlich des Blei analysiert. Es wird 10 mmol HCl verwendet, da diese Lösung aggressiver als aqua bidest.

ist und so auch fester an die Oberfläche adsorbiertes Blei lösen kann.

Auch die Meßkolben und Glaspipetten, mit denen die Bleistandardlösung angesetzt wird, werden auf Bleikontamination untersucht.

Die Reagenzien Isopropanol, Lumatom® und aqua bidest, die zur Probenaufbereitung und zum Ansetzen des Bleistandards verwendet werden, werden direkt ohne Verdünnung in die Küvette eingegeben und so auf Blei untersucht.

Dabei hat sich gezeigt, daß einige Lumatom-chargen erhebliche Mengen Blei enthalten, während andere Chargen bleifrei sind. Für die bleibelasteten Chargen ist die Erstellung eines Blindwerts erforderlich.

Die anderen Reagenzien und die Spülflüssigkeit der Laborgegenstände sind bleifrei und bilden somit für die Probe keine Kontaminationsquelle.

Dennoch werden die oben beschriebenen Untersuchungen engmaschig wiederholt, um Bleikontaminationen einer neuen Charge von Reagenzien oder Laborgegenständen sofort zu erkennen.

Einer Kontamination durch die Luft wird dadurch vorgebeugt, daß Probe und Reagenzien stets verschlossen gehalten werden. Pipettenspitzen, Polystyrolröhrchen und ähnliche Gegenstände werden nach Möglichkeit in der Originalverpackung belassen oder in bleifreien Plastikdosen gelagert.

2.4.3. Auswahl der geeigneten Geräteparameter

2.4.3.1. Küvetten und Probevolumen

Die zu messende Probe wird in einen Graphitrohrofen, auch Küvette genannt, eingebracht, getrocknet, verascht und verdampft. Beim Hitachi 170-70 stehen zwei verschiedene Küvettentypen zur Auswahl:

cup-type Küvette

tube-type Küvette

Abbildung 6: Verschiedene Küvettentypen

Bei der tube-type Küvette liegt die Probe im Strahlengang und breitet sich unregelmäßig im Rohr aus, während die Probe bei der cup-type Küvette stets in der Tasse des Rohrs liegt. Wahrscheinlich ist dies der Hauptgrund für die wesentlich bessere Reproduzierbarkeit bei Messungen mit der cup-type Küvette, wobei die Unterschiede besonders deutlich beim Messen von Blut- und Serumproben sind.

Ein weiterer Vorteil der cup-type Küvette liegt im höheren Probevolumen: Die Firma Hitachi gibt als maximales Probevolumen für die tube-type Küvette 20 µl, für die cup-type Küvette 50 µl an. Beide Angaben sind zwar unrealistisch, doch während man in die tube-type Küvette gerade 10 µl eingeben kann, so erhält man bei der cup-type Küvette immerhin noch bei 30 µl Probevolumen hervorragend reproduzierbare Werte. Das Probevolumen, das bei der Bleimessung in die Graphitrohrküvette eingegeben wird, beträgt 20 µl.

Die Küvetten sind an beiden Seiten in einen Graphitkonus eingepaßt. Über diesen Konus werden die Küvetten durch einen hohen Strom (bis max. 310 A) aufgeheizt. Dabei entspricht jedem Strom eine bestimmte Temperatur, wobei mit dem Strom auch die Temperatur ansteigt (Abb. 7). Die Lebensdauer der Küvetten ist maßgeblich von der maximalen Temperatur (= Atomisierurgstemperatur) der Messung abhängig. Bei einer Temperatur von 1600 °C ($\hat{=}$ 195 A), dies entspricht der Atomisierungstemperatur für Blei, kann man die Küvetten für ca. 80 - 100 Messungen verwenden. Danach wird die innere Oberfläche der Küvetten unregelmäßig: Es bilden sich Plaques, die aus Küvettenbestandteilen und Rückständen der Probe bestehen. Diese Plaques führen zu einer Schwächung des Lichtstrahls. In Extremfällen kann es sogar zu einer Verformung der Küvette kommen. Außerdem wird die Küvette infolge der Küvettenalterung ungleichmäßig aufgeheizt. Dies führt dann zu sogenannten Nachpeaks in der Atomisierungsphase und zu schlechter Reproduzierbarkeit der Einzelmessung. Auch die Graphitkonus müssen nach einer gewissen Zeit er-

neuert werden, da sonst die Aufheizung der Küvette ebenfalls ungleichmäßig erfolgt, und es zu Funkenschlag zwischen Küvette und Konus kommt. Die Konus halten allerdings wesentlich länger als die Küvetten (ca. 2000 Messungen). Es empfiehlt sich, stets beide Konus gleichzeitig zu erneuern.

Küvette : cup-type Küvette

Probevolumen : 20 µl

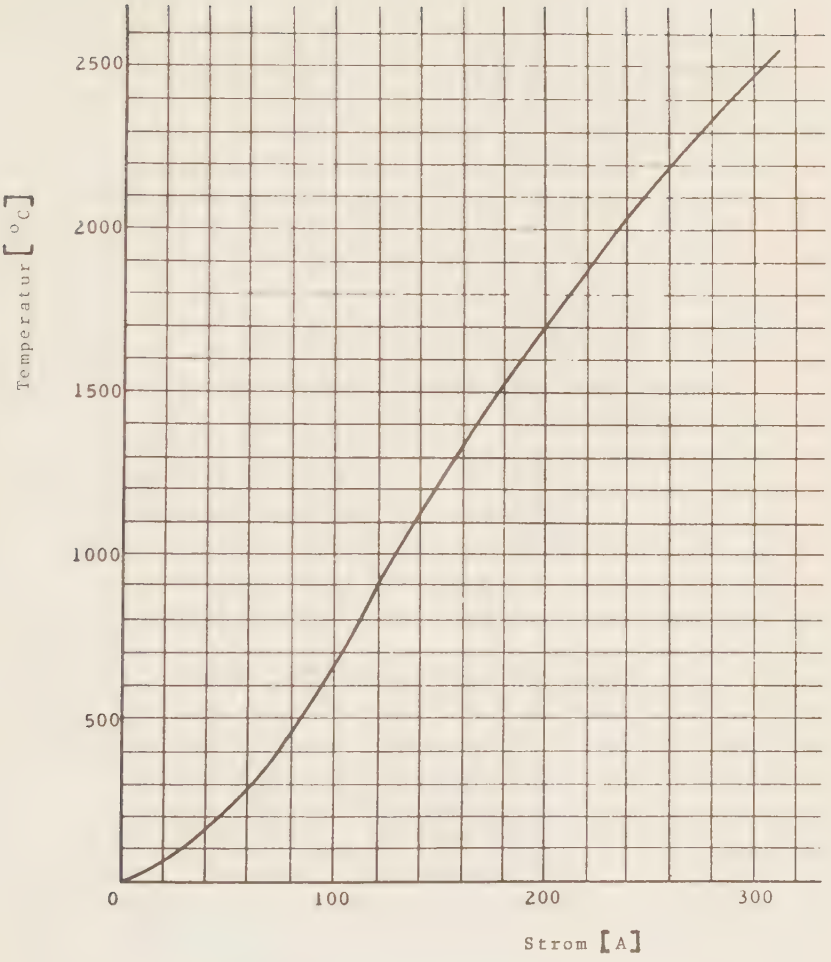


Abbildung 7: Beziehung zwischen Küvettenstrom und -temperatur für eine cup-type Küvette bei Hitachi 170-70 (Herstellerangabe)

2.4.3.2. Wellenlänge, Spalt und Aufzeichnungsbedingungen

Die Bleimessungen werden unter folgenden Meßbedingungen vorgenommen:

Lichtquelle	:	Hohlkathodenlampe der Firma Hammamatsu, Japan
Lampenstrom	:	1o mA
Wellenlänge	:	283,3 nm
Spalt	:	2

Die Messungen werden auf einem Zweikanalschreiber registriert. Auf dem ersten Kanal wird die Extinktion, und auf dem zweiten der unspezifische Untergrund aufgezeichnet. Die Höhe des Extinktionspeaks kann durch Änderung der Antwortgeschwindigkeit (= Response) und der Spreizung (= Expansion) variiert werden. Dabei führt eine Erhöhung von Response und Expansion auch zu einer Erhöhung von Grundrauschen und Peakhöhe. Bei der Bleibestimmung werden folgende Meßbedingungen gewählt:

1. Kanal Extinktionsanzeige

Response	:	2
Expansion	:	4
Schreiber Maximalausschlag	:	5 mV

2. Kanal Untergrundregistrierung

Schreiber Maximalausschlag	:	100 mV

2.4.3.3. Temperaturprogramm und Gaseinstellung

Die Aufheizung der Küvette läuft in vier Schritten ab:

dry - ash - atom - booster

1) dry-phase

In dieser Trocknungsphase kann man entweder eine konstante Temperatur und eine konstante Zeit einstellen (step-mode), oder die Temperatur kontinuierlich bis zu einem Endwert steigern (ramp-mode). Letztere Methode ist vorzuziehen, da durch das langsame Erhitzen ein Brodeln und Überkochen der Probe verhindert wird, und die Werte besser reproduzierbar sind.
Programm für Bleimessung:

dry	0-10 A	1	A/s
	10-24 A	0,15	A/s

2) ash-phase

In der ash-phase ist die Temperatur so zu wählen, daß die Probe zwar völlig verascht wird, aber noch kein Blei in dieser ash-phase verdampft. Um die optimale Temperatur zu ermitteln, mißt man eine Blei-Probe bei verschiedenen Veraschungstemperaturen. Bei zu hohen Temperaturen erkennt man dann einen Absorptionspeak in der ash-phase und eine Depression des Peaks in der Atomisierungsphase (Abb. 8).
Programm für Bleimessung:

ash	60 A	40 sec

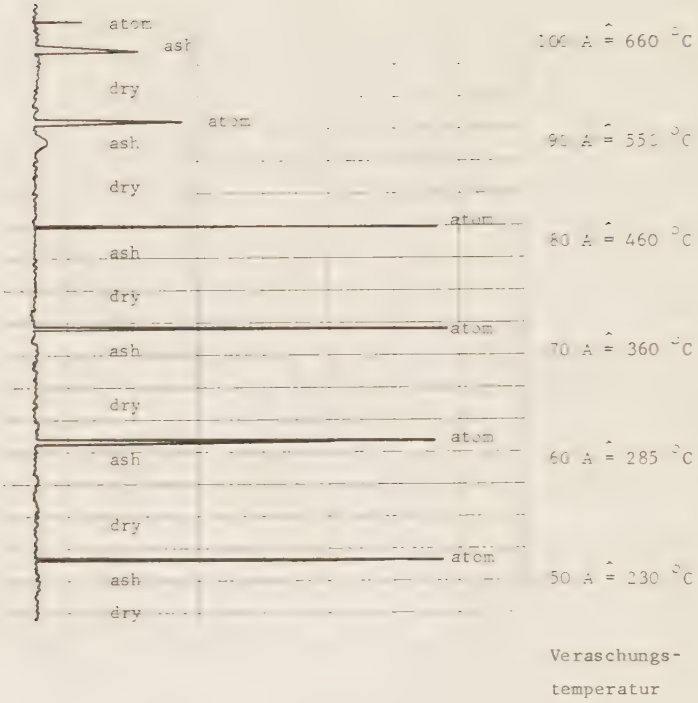


Abbildung 8: Ein wässriger Standard wird getrocknet und 60 sec bei unterschiedlichen Temperaturen verascht. Dabei zeigt sich ein Bleiverlust in der ash-phase und eine konsekutive Abnahme des atom-peaks bei Temperaturen über 460 °C.

3) atom-phase

Es gibt für jedes Element einen Temperaturbereich für die atom-phase, in dem der Extinktionspeak eine maximale Höhe erreicht. Bei Temperaturen oberhalb und unterhalb dieses Temperaturbereichs kommt es zu einer Peak-Depression.
Programm für die Bleimessung:

atom	200 A	7,5 sec

4) booster-phase

Nach der Atomisierungsphase wird die Küvette automatisch für 3 sec auf eine Temperatur, die noch über der Atomisierungstemperatur liegt, aufgeheizt, um so eventuelle Rückstände der Probe aus dem Rohr zu entfernen.

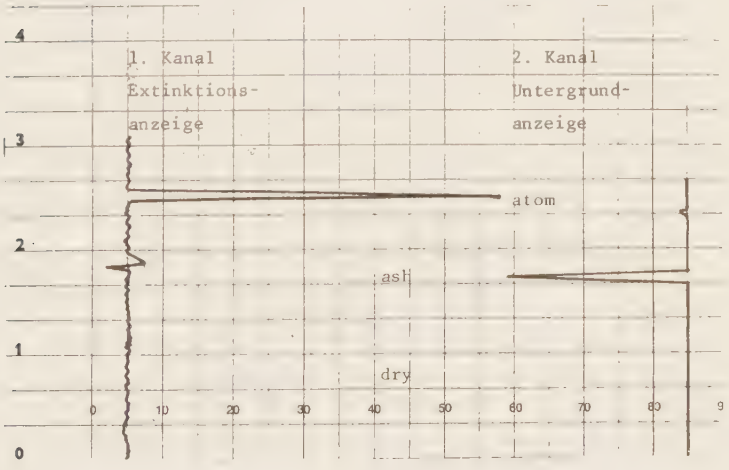


Abbildung 9: Originalregistrierung einer Bleimessung

Abbildung 9 zeigt die Originalregistrierung einer Bleimessung. Die Messung ist dann optimal, wenn kein Brodeln und Kochen in der dry-phase, erkennbar an Störpeaks der Extinktions- und Untergrundregistrierung, auftritt. Ferner sollte der Untergrundpeak in der Atomisierungsphase möglichst klein sein. Das Signal zu Beginn der Veraschungsphase ist unspezifisch und wird durch den Rauch der veraschten Probe verursacht.
Da beim Meßvorgang erhebliche Temperaturen auftreten, wird das Gerät durch eine Umwälzpumpe wassergekühlt. Die Küvette befindet sich außerdem in einer Argon-Gas-Atmosphäre, da sie sonst mit dem Luftsauerstoff reagieren würde. Dieser Argon-Gas-Strom (= Sheate Gas) kann variiert werden. Je höher der Gasstrom ist, um so länger ist auch die Küvettenlebensdauer. Dabei hat das Sheate Gas auf die eigentliche Messung keinerlei Einfluß, da es außen an der Küvette vorbeigeleitet wird. Sämtliche Blei- und Manganmessungen werden mit einem Sheate-Gas-Fluß von 4 l/min gefahren.
Zusätzlich wird die Küvette von innen durch das sogenannte Träger- oder Carriergas durchströmt. Dies beeinflußt die Messung in vier Punkten:

1) Durch das Carriergas wird der Trocknungsprozeß in der dry-phase erleichtert.

2) Die Rußpartikel der veraschten Probe werden durch den Carriergasstrom während der ash-phase aus der Küvette geleitet und stören daher nicht die Messung der Extinktion in der Atomisierungsphase.

3) Bei höherem Carriergasstrom kommt es zu einer schnelleren Passage des Atomdampfes durch die Küvette. Dies führt zu einer geringeren Absorption des Lichtstrahls sowie zur Depression des Extinktionspeaks.

4) Die Extinktion und die Atomdampfkonzentration sind nur in einem kleinen Konzentrationsbereich einander proportional. Erhöht man den Carriergasstrom, so vergrößert man den Bereich der Proportionalität, so daß diese auch bei höheren Konzentrationen noch gegeben ist.

Die unter Punkt 3) und 4) beschriebenen Zusammenhänge sind in Abbildung 10 dargestellt.

Für die Bleimessungen ist ein Carriergasstrom von 40 ml/min am günstigsten: Einerseits verläuft die Standardadditionseichkurve in linearen Bereich, andererseits sind die Extinktionspeaks nicht zu stark herabgesetzt.

Programm für die Bleimessung

Sheate Gas	4 l/min
Carrier Gas	40 ml/min

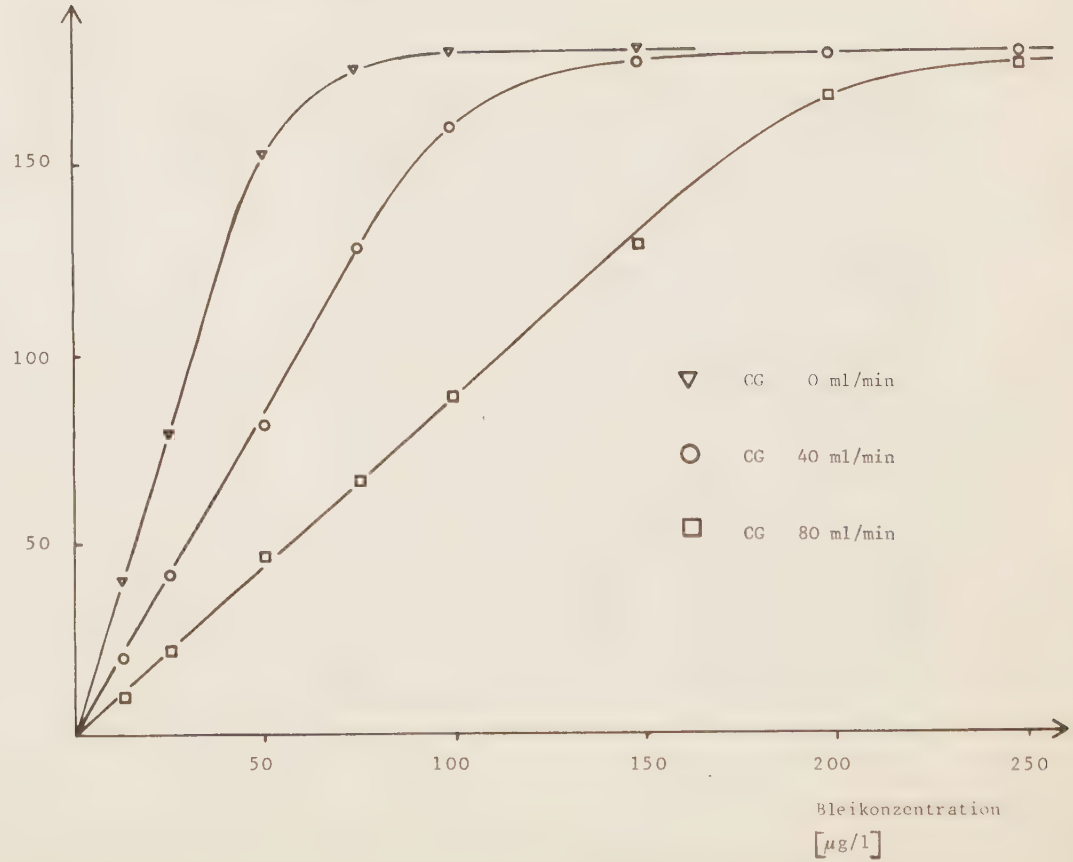


Abbildung 10:

Eichkurven eines wässrigen Bleistandards bei unterschiedlichen Carriergasströmen

2.4.3.4. Probenaufbereitung und Eichung

Verdünnt man das Vollblut im Verhältnis 1 : 20, so kommt es trotz der hohen Verdünnung immer noch zu Schaumbildung in der dry-phase, und dadurch wird die Reproduzierbarkeit der Einzelmessung verschlechtert. Außerdem ist die Veraschung unzureichend, so daß es in der Atomisierungsphase zu Störungen durch den Untergrund kommen kann. Eine weitere Verdünnung ist aber nicht möglich, da dann die Bleikonzentration so gering wird, daß das Signal-Rausch-Verhältnis und die Peak-Höhe abnehmen, und eine zuverlässige Messung daher nicht möglich ist. Deshalb muß das Blut anders als durch reine Verdünnung aufbereitet werden: Dazu homogenisiert man das Blut mit einem quartären Ammoniumhydroxid = Lumatom^{R} und fügt Isopropanol zur Vermeidung der Schaumbildung sowie einen Inneren Standard zur Eichung hinzu.

Genaue Probenzusammensetzung:

500 l Isopropanol
500 l Lumatom^{R}
300 l Blut
60 l Innerer Standard

1. Röhrchen 0 µl 500 µg/l Blei-Standard
+ 60 µl H_2O
2. Röhrchen 20 µl 500 µg/l Blei-Standard
+ 40 µl H_2O
3. Röhrchen 40 µl 500 µg/l Blei-Standard
+ 20 µl H_2O
4. Röhrchen 60 µl 500 µg/l Blei-Standard
+ 0 µl H_2O

Dabei ist darauf zu achten, erst Isopropanol und Lumatom^{R} in das Röhrchen vorzulegen, zu mischen, dann das Blut zuzugeben und die Probe anschließend sofort wieder auf dem Turbo-Mixer gut durchzumischen. Bei anderem Vorgehen besteht die Gefahr, daß sich kleine Klümpchen bilden, und die Probe inhomogen wird. Die Messung soll innerhalb der nächsten Stunden erfolgen. Eine Schaumbildung in der dry-phase tritt bei der so aufbereiteten Probe nicht ein. Auch die Veraschung ist so vollständig, daß keine Störungen in der Atomisierungsphase vorkommen. Dies kann man auch an dem kleinen Untergrundpeak in der Atomisierungsphase erkennen (Abb. 9).

Wie aus der obigen Auflistung der Probenzusammensetzung hervorgeht, wird das Blut mit bekannten Bleistandards aufgestockt. Man erstellt dann an Hand der Extinktionspeaks der unterschiedlich aufgestockten Proben eine Standardadditionsgerade (Abb. 11). Der Abszissenschnittpunkt gibt die, durch das aus dem Blut stammende Blei bedingte, Bleiursprungskonzentration an. Um den Bleigehalt im Vollblut zu ermitteln, muß diese Ursprungskonzentration dann noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Gegebenenfalls muß man noch den Lumatomblindwert berücksichtigen.

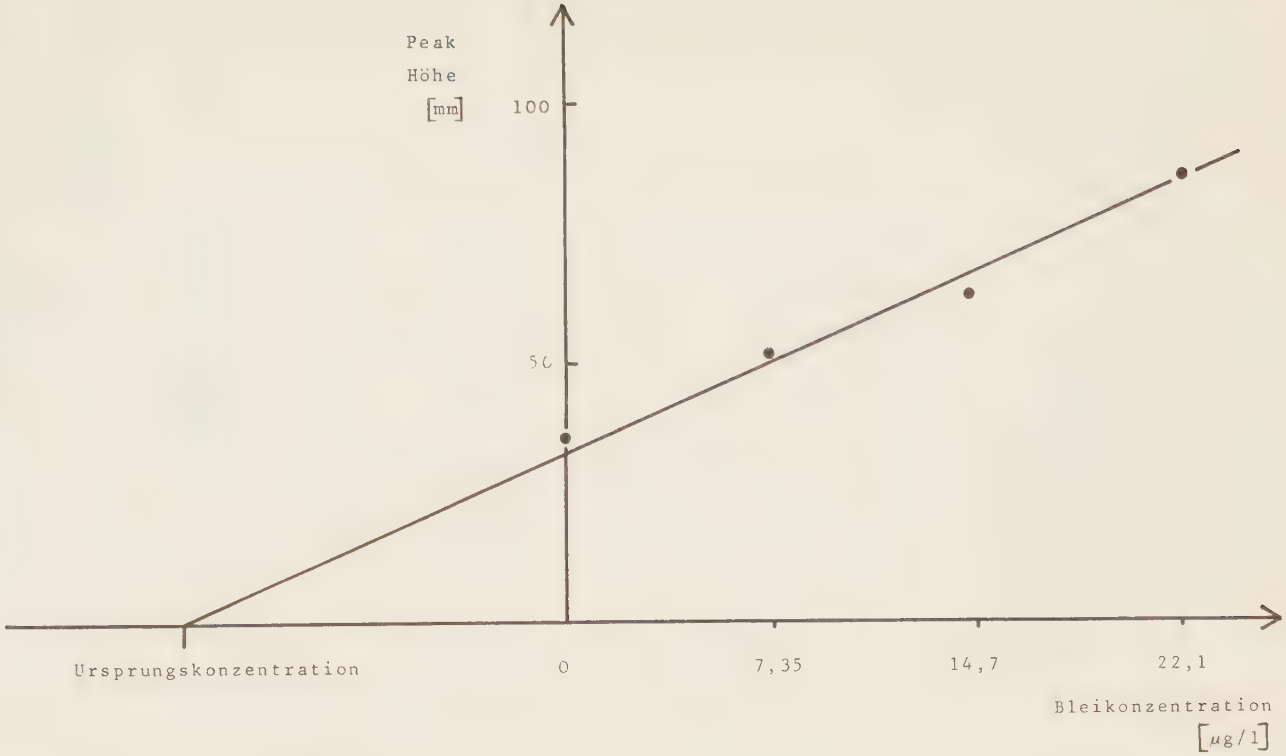


Abbildung 11: Standardadditionsgerade für eine Bleimessung

Berechnung:

Durch die Meßpunkte der Standardadditionsgeraden wird eine Regressionsgerade gelegt:

Formel der Regressionsgerade:

$$y = mx + b$$

$$m = \frac{\Sigma(x_i y_i) - \frac{\Sigma x_i \, \Sigma y_i}{n}}{\Sigma x_i^2 - \frac{(\Sigma x_i)^2}{n}}$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

Abszissenschnittpunkt x_o

$$x_o = -\frac{b}{m}$$

Den Blutbleiwert erhält man durch Multiplikation der Bleiursprungskonzentration ($\hat{=}$Abszissenschnittpunkt) mit dem Verdünnungsfaktor f

$$f = \frac{\text{Volumen (Gesamtprobe)}}{\text{Volumen (Blut)}} = \frac{1360}{300} = 4{,}53$$

Im Falle einer Lumatomkontamination muß vom Blutbleiwert noch der Lumatomblindwert abgezogen werden, der sich folgendermaßen berechnet:

$$\text{Blindwert} = \text{Bleikonzentration}_{\text{Lumatom}} \times \frac{\text{Volumen (Lumatom)}}{\text{Volumen (Blut)}}$$

$$= \text{Bleikonzentration}_{\text{Lumatom}} \times 1{,}67$$

Das aufwendige Verfahren der Standardaddition ist erforderlich, weil die Blutbleibestimmung nicht einfach durch eine Vergleichsmessung von Blut und wässrigem Standard erfolgen kann, da aufgrund der unterschiedlichen Matrix das Blei den Lichtstrahl in wässriger Lösung und Blut unterschiedlich stark absorbiert.
Die Standardadditionsgeraden sind bei der Bleimessung weitgehend parallel:

Laufende Proben-Nr.	Geradensteigung m
1	1,93
2	2,12
3	2,06
4	1,92
5	2,01
6	2,24
7	1,98
8	2,25
9	2,03
10	1,96

Mittelwert	$\bar{m}$	= 2,05
Standardabweichung	s	= $\pm$ 0,12
rel. Standardabweichung	s_{rel}	= $\pm$ 5,8 %

Tabelle 4: Geradensteigung der Bleistandardadditionsgeraden

Die Abweichungen der Geradensteigungen sind auf unsystematische Fehler und Unterschiede zwischen den Bluten zurückzuführen. Wegen der weitgehend konstanten Steigung der Regressionsgeraden ist es ausreichend, pro Blut eine nicht aufgestockte Probe zu messen und an Hand der bekannten Steigung den Abszissenschnittpunkt auszurechnen.

Allerdings ist darauf zu achten, daß sich die Steigung der Standardadditionsgeraden durch Küvettenalterung mit der Zeit ändert, so daß nach einigen Messungen zur Kontrolle der Steigung wieder eine vollständige Gerade erstellt werden muß.

Wegen der größeren Genauigkeit sind die Bleiwerte sämtlicher im Rahmen dieser Arbeit analysierten Proben durch das vollständige Standardadditionsverfahren ermittelt worden. Der Zeitaufwand für jedes zu analysierende Blut beträgt dabei ca. 25 Minuten.

2.4.3.5. Wiederfindung und Präzision

Wiederfindungsberechnungen an Hand der Standardadditionsmethode haben ergeben:

1. bei Aufstockung um 7,35 µg/l

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	48	51	0,94
2	40	45	0,88
3	58	58	1,00
4	60	62	0,97
5	45	43	1,05
6	69	70	0,99
7	43	43	1,00
8	57	57	1,00
9	41	39	1,05
10	57	58	0,98
11	64	66	0,97
12	46	46	1,00
13	72	73	0,97

Tabelle 5: Wiederfindung bei Aufstockung um 7,35 µg/l

Für sämtliche n = 13 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 7,35 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 98\ \%$$

2. bei Aufstockung um 14,7 µg/l

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	72	68	1,06
2	67	63	1,06
3	72	73	0,99
4	94	97	0,97
5	56	58	0,97
6	88	84	1,05
7	55	57	0,96
8	74	72	1,03
9	55	55	1,00
10	74	75	0,99
11	81	80	1,01
12	61	61	1,00
13	89	86	1,03

Tabelle 6: Wiederfindung bei Aufstockung um 14,7 µg/l

Für sämtliche n = 13 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 7,35 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 101\ \%$$

3. bei Aufstockung um 22,1 µg/l

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	83	86	0,96
2	79	82	0,96
3	86	86	1,00
4	116	113	1,03
5	77	75	1,03
6	95	98	0,97
7	76	73	1,04
8	89	90	0,99
9	69	70	0,99
10	92	92	1,00
11	94	94	1,00
12	74	74	1,00
13	101	100	1,01

Tabelle 7: Wiederfindung bei Aufstockung um 22,1 µg/l

Für sämtliche n = 13 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 7,35 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 100\ \%$$

Zur Präzisionskontrolle wurde ein Blut an verschiedenen Tagen als Kontrolle mitanalysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 8 dargestellt.

Laufende Nummer n	gemessene Bleikonzentration x_i in µg/l
1	136
2	95
3	105
4	116
5	103
6	134

$\bar{x}$ = 115 µg/l

s = ± 17 µg/l

V_k = ± 15 %

Tabelle 8: Bleikonzentration eines wiederholt analysierten Blutes

2.5. Messung von Mangan im Serum

2.5.1. Probensammlung und Lagerung

Da Mangan im Serum bestimmt wird, muß das in Polystyrolröhrchen abgenommene Blut bis zur Gerinnung stehengelassen und dann abgesert werden. Üblicherweise erfolgt das Abseren durch Zentrifugieren, nachdem Glaskügelchen zur besseren Trennung der festen und flüssigen Phase zugesetzt worden sind. Da diese Kügelchen massiv mit Mangan kontaminiert sind, darf dieses Verfahren nicht gewählt werden. Stattdessen wird das gewonnene Blut einfach zentrifugiert und der Serumüberstand mit einer 1000 µl Eppendorf Pipette in ein zweites Polystyrolröhrchen pipettiert. Dann wird das so gewonnene Serum tiefgefroren. Eine Änderung der Mangankonzentration tritt auch bei längerer Lagerung nicht ein.

2.5.2. Kontaminationskontrolle

Die bei der Probenaufbereitung verwendeten Reagenzien, Aqua bidest. und Isopropanol, sind manganfrei. Dies wird durch Direkteingabe des Reagenz geprüft. Die mit der Probe in Berührung kommenden Laborgeräte, Pipettenspitzen, Polystyrolröhrchen und Plastikspritzen werden für 24 Stunden mit 10 mmol HCl Lösung gefüllt, bzw. über 24 Stunden in eine 10 mmol HCl Lösung gelegt, ohne daß eine Kontamination der Salzsäurelösung gemessen werden kann. Die Salzsäurelösung, in die die Kanüle gelegt worden ist, weist nach einer halben Stunde noch keine, nach 24 Stunden jedoch eine geringe Mangankontamination auf.

Die Meßkolben, in denen die Manganstandardlösungen angesetzt werden, sind leicht kontaminiert und müssen durch Kochen in HNO_3 und anschließendem Spülen in Aqua bidest. gereinigt werden.

2.5.3. Geräteparameter

2.5.3.1. Küvetten

Zur Manganmessung werden Küvetten vom cup-type verwendet (s.2.3.4.1.). Da Mangan bei der relativ hohen Temperatur von 2300 °C ($\hat{=}$ 27o A) atomisiert wird, sind die Küvetten nur für 40 - 50 Messungen verwendbar. Bei den ersten Messungen mit einer neuen Küvette erscheint in der boosterphase ein bedeutungsloser Nachpeak, der nach ca. 10 Messungen verschwindet und nicht die Höhe des Extinktionspeaks beeinflußt.

Küvette	:	cup-type Küvette
Probevolumen	:	30 µl

2.5.3.2. Wellenlänge, Spalt und Aufzeichnungsbedingungen

Die Manganmessungen werden unter folgenden Meßbedingungen durchgeführt:

Lichtquelle	:	Hohlkathodenlampe der Firma Hammamatsu, Japan
Lampenstrom	:	15 mA
Wellenlänge	:	279,9 nm
Spalt	:	3

Aufzeichnungsbedingungen:

1. Kanal Extinktionsanzeige

Response	:	2
Expansion	:	2,5
Schreiber Maximalausschlag	:	1mV

2. Kanal Untergrundregistrierung

Schreiber Maximalausschlag	:	100 mV

2.5.3.3. Temperaturprogramm und Gaseinstellung

1) dry-phase

In der dry-phase muß die Probe extrem langsam getrocknet werden, da es sonst zum Überkochen und konsekutiv zu schlechter Reproduzierbarkeit kommt. Der unspezifische Peak in der dry-phase (Abb. 12) kommt durch das Zusammenballen der Serumprobe in der Küvette während der Trocknung zustande. Dadurch gelangt ein Teil der Probe in den Strahlengang und ruft diesen unspezifischen Peak hervor. Auf die Reproduzierbarkeit hat dieses Zusammenballen der Serumprobe keinen negativen Einfluß.
Programm für die Manganmessung:

dry	0 - 14 A	1	A/sec
	14 - 20 A	0,05	A/sec

2) ash-phase

Mangan ist nicht so flüchtig wie Blei und geht erst bei 800 °C (≙ 110 A) verloren. Als Veraschungstemperatur wird daher 600 °C (≙ 95 A) gewählt.
Programm für die Manganmessung:

ash	95 A	50 sec

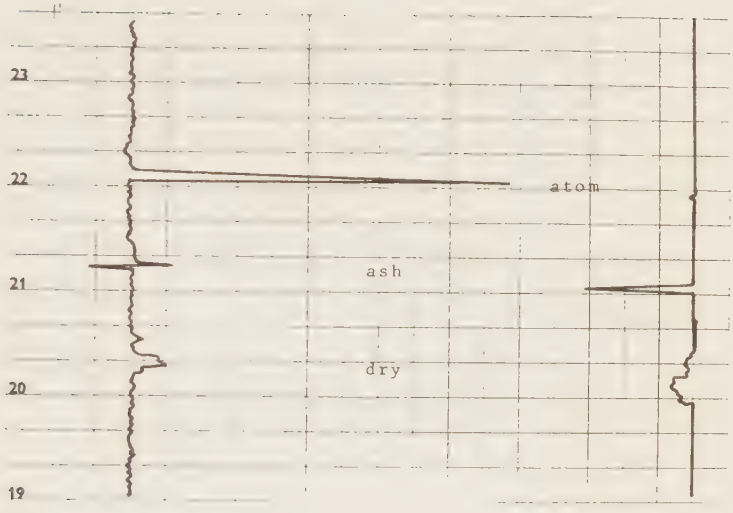
3) atom-phase

Als relativ schwer flüchtiges Element benötigt Mangan eine ziemlich hohe Atomisierungstemperatur (2300 °C). Programm für die Manganmessung:

atom	270 A	7,5 sec

4) booster-phase

Hier liegt die Temperatur bei 2600 °C (≙ 310 A)



1. Kanal

Extinktions-
anzeige

2. Kanal

Untergrund-
anzeige

Abbildung 12: Originalregistrierung einer Manganmessung

Von überragender Bedeutung ist bei der Mangan-messung der Carriergasstrom. In der dry-phase und in den ersten 30 sec der ash-phase muß mit einem hohen Carriergasstrom von 200 ml/min gefahren werden, da die Probe sonst nicht gut trocknet, bzw. die Rußpartikel während der ash-phase nicht aus der Graphitrohrküvette entfernt werden und dann die Messung in der atom-phase massiv stören. Schon ein unsymmetrischer Gasstrom durch die Küvette kann den Abtransport der Rußpartikel so stark beeinträchtigen, daß eine Messung des Extinktionspeaks in der atom-phase durch den dann noch vorhandenen Untergrund unmöglich gemacht wird. Bei einem symmetrisch eingeleiteten Gasstrom von 200 ml/min ist in der atom-phase jedoch kein störender Untergrund mehr vorhanden (s. Abb. 12, Untergrundpeak in der atom-phase: 2mm), und es wird ein sauberer Meßpeak für die Extinktion registriert.
Während der Gasfluß in der dry- und in den ersten 30 sec der ash-phase also 200 ml/min beträgt, wird er in den letzten 20 sec der ash- und in der atom-phase auf 0 ml/min eingestellt. Dieser Gasstop ist erforderlich, da durch die sonst eintretende Carriergas bedingte Peak-Depression (2. Kap. 2.4.3.2.) ein verwertbarer Extinktionspeak nicht gemessen werden kann.

Im folgenden stellt sich noch die Frage, ob nicht durch den starken Rauchstrom auf mechanischem Wege Mangan verloren geht. Dazu wird der Extinktionspeak einer aufgestockten und bei einem CG von 200 ml/min getrockneten und veraschten

Serumprobe (CG in atom-phase: 0 ml/min) mit dem Extinktionspeak einer wässrigen Lösung verglichen, die bei einem Carriergas von 0 ml/min getrocknet, verascht und atomisiert wird. Die Aufstockung der Serumprobe um 1 µg/l ergibt einen genauso hohen Extinktionspeak, wie eine rein wässrige Standardlösung von 1 µg/l. Demnach geht kein Mangan in der Veraschungsphase mit einem Carriergasstrom von 200 ml/min verloren.
Weil die Mangankonzentration der aufbereiteten Proben sehr gering ist (ca. 4 µg/l), kann mit einem CG von 0 ml/min in der Atomisierungsphase gefahren werden, da in diesem Konzentrationsbereich auch bei einem CG von 0 ml/min Extinktion und Mangankonzentration einander proportional sind.

Carrier-Gas:	200 ml/min	in	dry-phase 30 sec ash-phase
	0 ml/min	in	20 sec ash-phase atom-phase

2.5.3.4. Probenaufbereitung und Eichung

Die Seumprobe wird für die Messung folgendermaßen aufbereitet:

500 l Serum
100 l Aqua bidestillata
100 l Isopropanol
300 l Innerer Standard

1. Röhrchen 0 µl 10 µg/l Mangan-Standard
+ 300 µl H_2O

2. Röhrchen 100 µl 10 µg/l Mangan-Standard
+ 200 µl H_2O

3. Röhrchen 200 µl 10 µg/l Mangan-Standard
+ 100 µl H_2O

4. Röhrchen 300 µl 10 µg/l Mangan-Standard
+ 0 µl H_2O

Das Isopropanol wird zugesetzt, um ein zu starkes Schäumen der Probe zu verhindern. Mehr Isopropanol kann nicht zugesetzt werden, da dann die Serumeiweiße ausfallen, und die Probe inhomogen wird. Der Versuch, die Serumprobe gefrierzutrocknen und dann mit Lumatom^R zu homogenisieren, ist an der massiven Mangankontamination des Lumatom^R gescheitert.

In Analogie zur Bleimessung wird eine Standardadditionsgerade erstellt. Der Abszissenschnittpunkt, der die durch das Serummangan bedingte Manganursprungskonzentration angibt, liefert nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor des Serums f=2 die Mangankonzentration des Serums (Abb. 13).

Im Gegensatz zur Bleimessung unterscheiden sich die Steigungen der Standardadditionsgeraden bei der Manganmessung erheblich voneinander, da sich der Quotient Extinktionspeak/Mangankonzentration ändert. Dies ist auf zwei Faktoren zurückzuführen:

1. Die Küvette altert bei der hohen Atomisierungstemperatur sehr schnell.
2. In der Tasse der cup-type Küvette lagern sich veraschte Reste der Probe ab. Dies führt wegen der vergrößerten Oberfläche wahescheinlich zu einem schnelleren Verdampfen der Probe, damit zu einer anderen Verweilzeit des Atomdampfes im Strahlengang und zu einer Änderung der Extinktion bei gleicher Mangankonzentration.

Laufende Proben-Nr.	Geradensteigung m
1	31,5
2	35,1
3	42,3
4	46,5
5	41,6
6	39,3
7	36,0

Mittelwert	$\bar{m}$	= 38,9
Standardabweichung	s	= $\pm$ 5,08
rel. Standardabweichung	s_{rel}	= $\pm$ 13 %

Tabelle 9: Geradensteigungen der Mangan-standardadditionsgeraden

Wegen der stark voneinander abweichenden Steigungen der Geraden (Tab. 9) ist man darauf angewiesen, für jede Serumprobe eine eigene Standardadditionsgerade zu erstellen. Der Zeitaufwand für die Analyse einer Serumprobe beträgt ca. 45 Minuten.

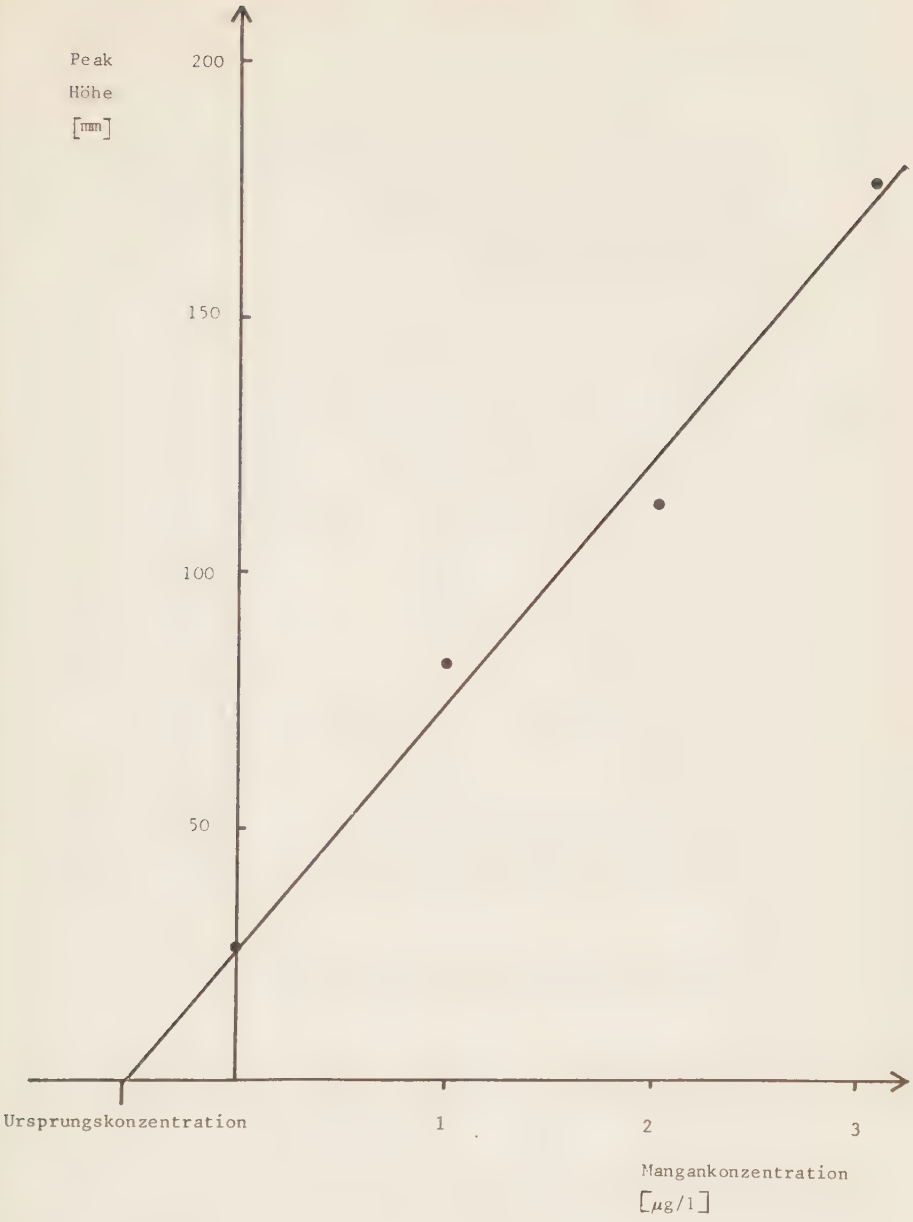


Abbildung 13: Standardadditionsgerade für eine Manganmessung

2.5.3.5. Wiederfindung und Präzision

Wiederfindungsberechnungen an Hand der Standardadditionsmethode haben ergeben:

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	43	46	0,935
2	50	52	0,962
3	55	55	1,000
4	63	65	0,969
5	52	54	0,963
6	58	55	1,055
7	56	56	1,000
8	54	54	1,000
9	52	55	0,945
10	76	77	0,987
11	65	62	1,048
12	71	74	0,959

Tabelle 10: bei Aufstockung um 1 µg/l

Für sämtliche n = 12 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 1 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 98,5\ \%$$

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	79	77	1,026
2	86	86	1,000
3	97	98	0,990
4	111	112	0,990
5	105	96	1,094
6	91	95	0,958
7	92	92	1,000
8	78	80	0,975
9	94	94	1,000
10	121	121	1,000
11	110	118	0,932
12	120	119	1,008

Tabelle 11: bei Aufstockung um 2 µg/l

Für sämtliche n = 12 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 2 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 100\ \%$$

Laufende Nummer n	gemessener Peak x_i	an Hand der Regressionsgeraden erwarteter Peak x_{iR}	Maß für die Wiederfindung $x_i : x_{iR}$
1	108	108	1,000
2	121	121	1,000
3	141	139	1,014
4	159	158	1,006
5	132	137	0,964
6	135	134	1,007
7	128	128	1,017
8	117	115	1,017
9	136	133	1,023
10	157	157	1,000
11	159	156	1,019
12	168	164	1,024

Tabelle 12: bei Aufstockung um 3 µg/l

Für sämtliche n = 12 Proben ergibt sich als Wiederfindung bei Aufstockung um 3 µg/l :

$$\frac{x_i : x_{iR}}{n} = 101\ \%$$

Zur Präzisionskontrolle wurde ein Serum an verschiedenen Tagen als Kontrolle mitanalysiert. Das Ergebnis ist in Tabelle 13 dargestellt.

Laufende Nummer n	gemessene Mangankonzentration x_i in µg/l
1	0,8
2	0,9
3	0,8
4	1,0

$\bar{x}$ = 0,875 µg/l

s = ± 0,0957 µg/l

V_k = ± 10,9 %

Tabelle 13: Mangankonzentrationen eines wiederholt analysierten Serums

3. Ergebnisse

3.1. Blei

Die Ergebnisse der Bleimessungen sind in Tabelle 14 und Abbildung 14 dargestellt.

	gut eingestellt	schlecht eingestellt
Diabetiker Typ I	$\bar{x}$ = 85,7	$\bar{x}$ = 87,2
	s = ± 14,8	s = ± 25,6
	n = 7	n = 21
	max = 108	max = 141
	min = 70	min = 42
Diabetiker Typ II	$\bar{x}$ = 84,86	$\bar{x}$ = 105,4
	s = ± 33,69	s = ± 31,31
	n = 14	n = 10
	max = 145	max = 167
	min = 40	min = 58
Normal-personen	$\bar{x}$ = 89,3	
	s = ± 29,3	
	n = 10	
	max = 140	
	min = 49	

Tabelle 14: Ergebniss der Bleimessung in µg/l

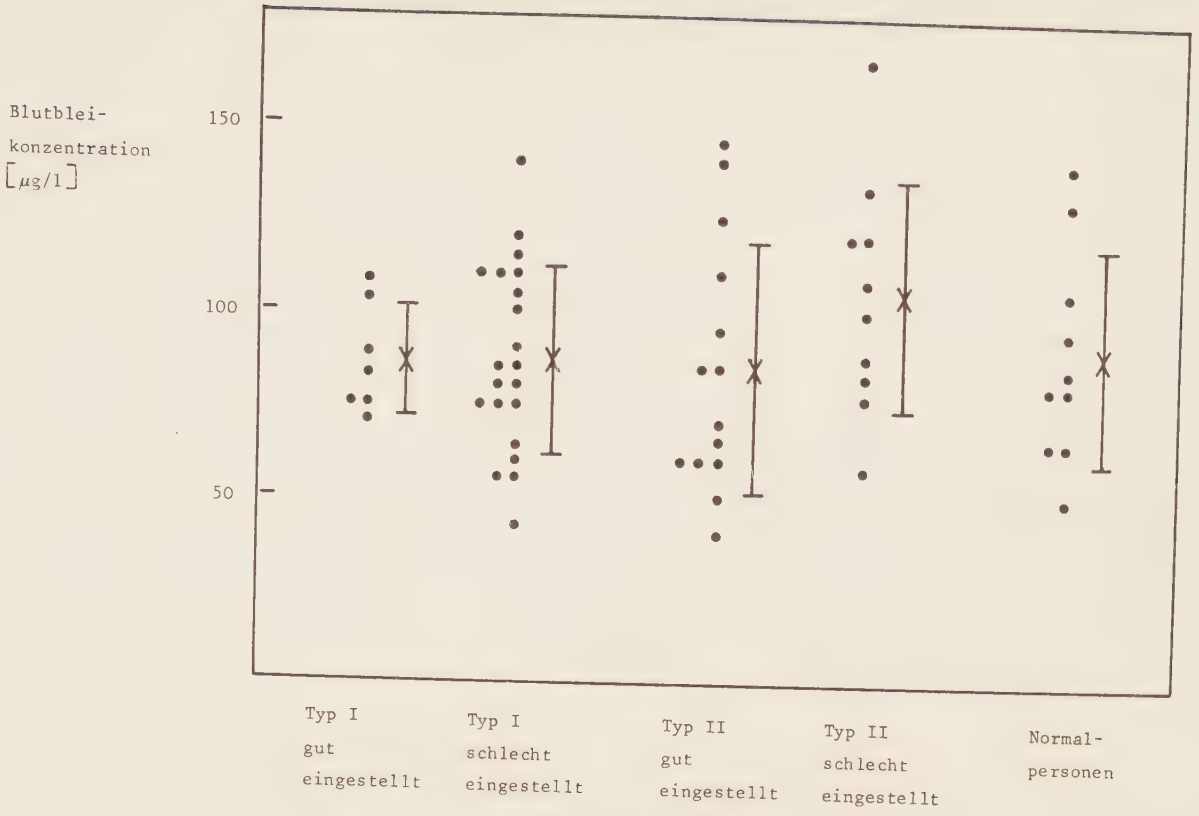


Abbildung 14: Ergebnisse der Bleibestimmungen

Es werden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Bestehen Unterschiede zwischen den drei Kollektiven

   Diabetiker Typ I = juvenile Diabetiker
   Diabetiker Typ II = Diabetiker vom Erwachsenentyp
   Normalpersonen

   Ergebnis: Die Varianzanalyse zeigt, daß die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

2. Bestehen Unterschiede zwischen

   gut eingestellten Diabetikern Typ I
   schlecht eingestellten Diabetikern Typ I

   Ergebnis: Der t-Test zeigt, daß die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

3. Bestehen Unterschiede zwischen

   gut eingestellten Diabetikern Typ II
   schlecht eingestellten Diabetikern Typ II

   Ergebnis: Es besteht ein Trend zu höheren Bleiwerten bei schlecht eingestellten Diabetikern. Der t-Test zeigt jedoch, daß diese Unterschiede bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht signifikant sind ($p = 0{,}144 > 0{,}05$).

Abbildung 15 und Tabelle 15 zeigen die Bleiwerte des Gesamtkollektivs nach Geschlecht aufgeschlüsselt.

männlich		weiblich	
$\bar{x}$	= 95,6	$\bar{x}$	= 83,6
s	= ± 30,1	s	= ± 25,2
n	= 32	n	= 30
max	= 167	max	= 140
min	= 40	min	= 42

Tabelle 15: Bleikonzentrationen des Gesamtkollektivs in µg/l

Der Mittelwert der Bleikonzentrationen ist bei dem männlichen Kollektiv größer als bei dem weiblichen. Dieser Unterschied ist aber bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht signifikant ($p = 0{,}093 > 0{,}05$).

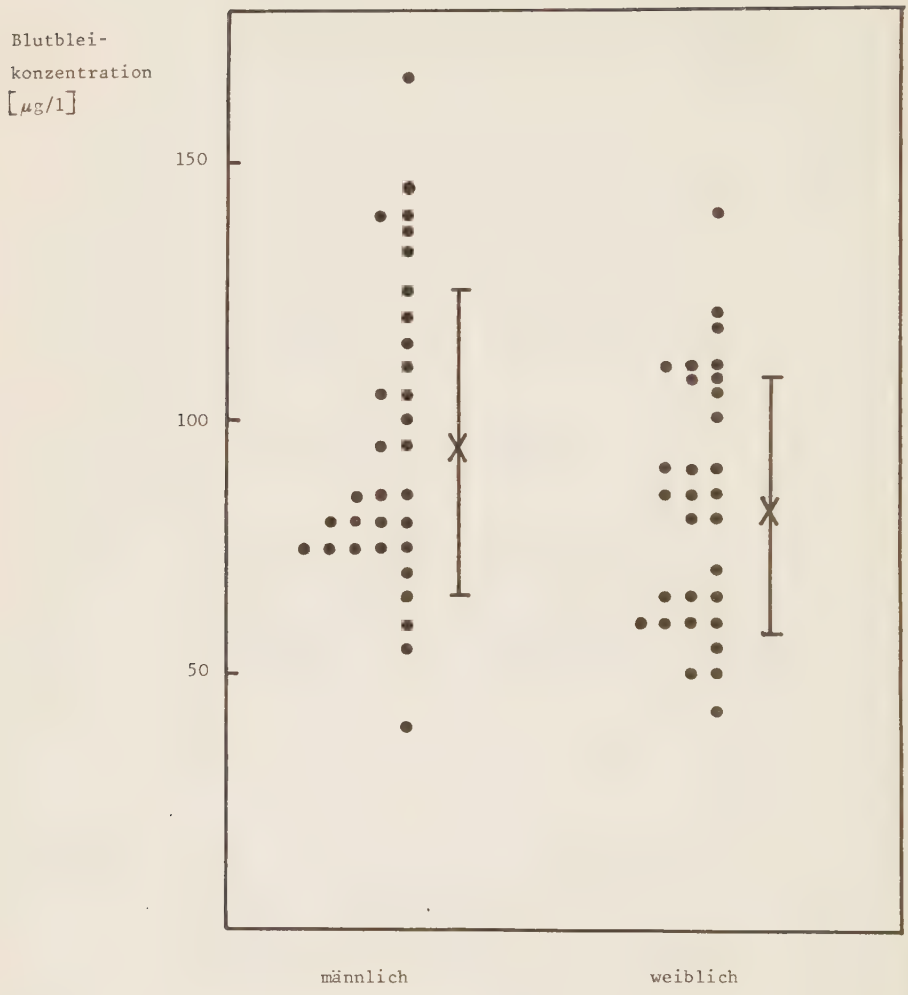


Abbildung 15: Blutbleikonzentrationen des Gesamtkollektivs nach dem Geschlecht aufgeschlüsselt

3.2. Mangan

Die Ergebnisse der Manganmessungen sind in Tabelle 16 und Abbildung 16 dargestellt.

	gut eingestellt	schlecht eingestellt
Diabetiker Typ I	$\bar{x}$ = 0,829	$\bar{x}$ = 0,953
	s = ± 0,18	s = ± 0,2125
	n = 7	n = 17
	max = 1,2	max = 1,4
	min = 0,7	min = 0,6
Diabetiker Typ II	$\bar{x}$ = 0,946	$\bar{x}$ = 0,922
	s = ± 0,328	s = ± 0,282
	n = 13	n = 9
	max = 1,6	max = 1,5
	min = 0,6	min = 0,6
Normalpersonen	$\bar{x}$ = 0,883	
	s = ± 0,237	
	n = 12	
	max = 1,3	
	min = 0,5	

Tabelle 16: Ergebnisse der Manganmessungen in µg/l

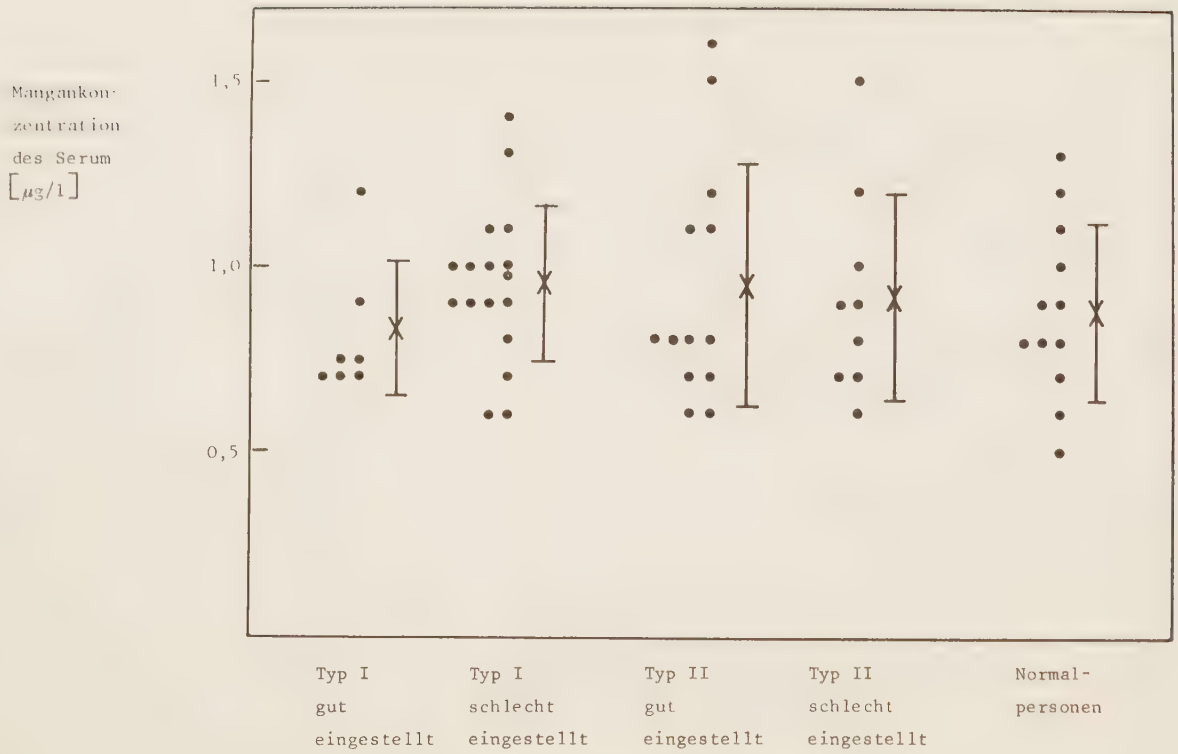


Abbildung 16: Ergebnisse der Manganbestimmungen

Es werden auch hier die Fragestellungen untersucht:

1. Bestehen Unterschiede zwischen den drei Kollektiven

   Diabetiker Typ I = juvenile Diabetiker
   Diabetiker Typ II = Diabetiker vom Erwachsenentyp
   Normalpersonen

   Ergebnis: Die Varianzanalyse zeigt, daß die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

2. Bestehen Unterschiede zwischen

   gut eingestellten Diabetikern Typ I
   schlecht eingestellten Diabetikern Typ I

   Ergebnis: Der t-Test zeigt, daß die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

3. Bestehen Unterschiede zwischen

   gut eingestellten Diabetikern Typ II
   schlecht eingestellten Diabetikern Typ II

   Ergebnis: Der t-Test zeigt, daß die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind.

Abbildung 17 und Tabelle 17 zeigen die Mangankonzentrationen des Gesamtkollektivs nach Geschlecht aufgeschlüsselt.

männlich		weiblich	
$\bar{x}$	= 0,96	$\bar{x}$	= 0,87
s	= ± 0,26	s	= ± 0,23
n	= 29	n	= 29
max	= 1,6	max	= 1,5
min	= 0,6	min	= 0,5

Tabelle 17: Mangankonzentration des Gesamtkollektivs in µg/l

Der Mittelwert der Mangankonzentration ist bei dem männlichen Kollektiv größer als bei dem weiblichen. Dieser Unterschied ist aber bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % statistisch nicht signifikant ($p = 0,174 > 0,05$).

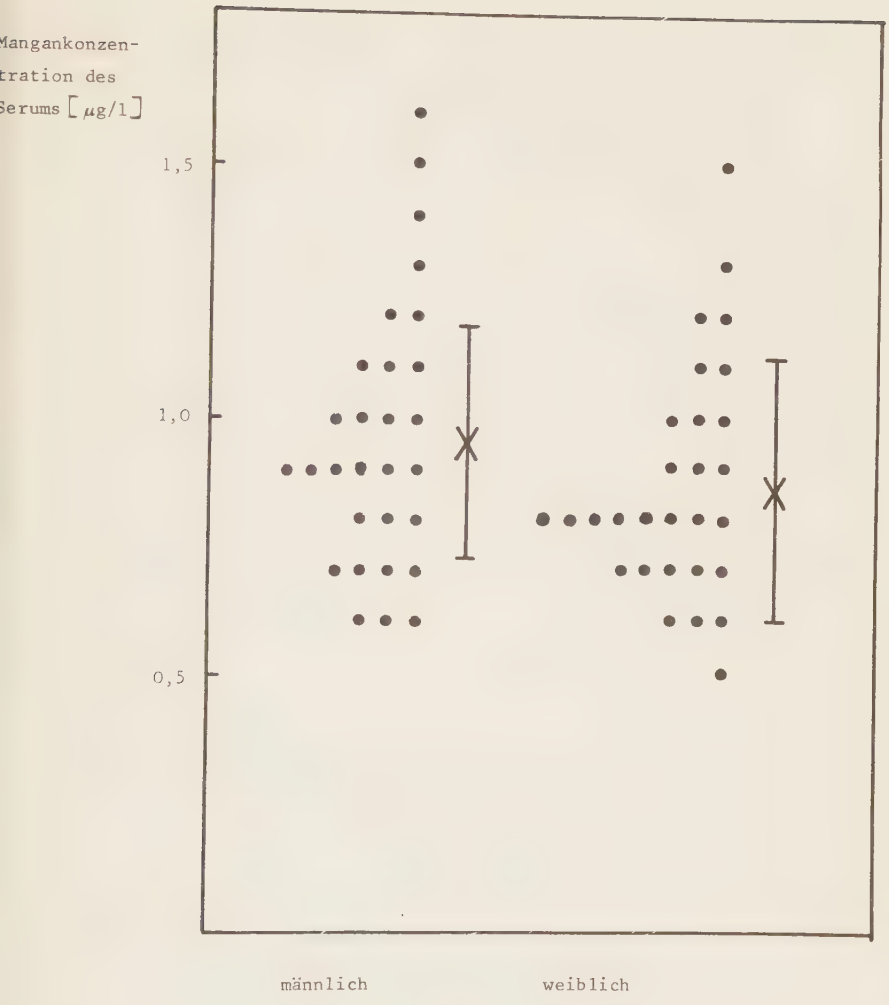


Abbildung 17: Serummangankonzentration des Gesamtkollektivs nach dem Geschlecht aufgeschlüsselt

4. Diskussion

4.1. Probensammlung und Probenlagerung

Dadurch, daß der Untersucher die Blutentnahme selbst vornimmt bzw. dabei anwesend ist und auch das anschließende Abseren durchführt, werden Fehler durch unbekannte und daher nicht überprüfte Arbeitstechniken eliminiert. So muß von der üblichen Technik des Abserens unter Zugabe von Glaskügelchen abgegangen werden, da diese durch Mangan kontaminiert sind. Stattdessen wird das Blut ohne Kügelchen zentrifugiert, und dann das Serum mit einer Eppendorf-Pipette abpipettiert. Dieses Abpipettieren ist nicht unproblematisch, da die Fibrinagglomerate sich unvollständig absetzen, und man diese beim Pipettieren ansaugen kann. Außerdem kann es durch das Ansaugen beim Pipettiervorgang zum Aufwirbeln von Erythrozyten und auch zur Hämolyse kommen. Das zwingt dann zum Verwerfen der Probe.
Da man die Proben schockgefrieren kann (- 4o ^{o}C) und dabei keine Veränderung in der Metallkonzentration eintritt, ist eine lange Lagerzeit möglich. Zudem kann man eine rationelle Meßtechnik anwenden, indem man die Proben mehrere Abnahmetage sammelt und dann an einem Tag in Serie durchmißt.

4.2. Kontamination

Ein zentrales Problem der Spurenelementanalytik ist die Vermeidung von Kontaminationen. Auf die Probleme beim Abseren, die eine spezielle Technik des Abserens erforderlich machen, ist schon hingewiesen worden. Die Reagenzien und Laborgegenstände werden ebenfalls

einer Kontaminationskontrolle unterzogen. Dabei muß jede neue Charge auch wieder neu untersucht werden. Die Technik dieser Kontrollen ist bereits beschrieben worden (2.4.2.). Schließlich bilden sich drei Punkte heraus, bei denen die Frage der Kontamination besonders beleuchtet werden muß:

1. Lumatom^{R}

   Einige Chargen des Lumatom^{R} sind massiv mit Blei kontaminiert (bis zu 3o μg/l), während andere kein Blei enthalten. Somit muß man für jede einzelne Lumatomcharge einen eigenen Blindwert erstellen.

2. Meßkolben

   Die Glasmeßkolben sind im Gegensatz zu den verwendeten Plastikgegenständen mit Mangan kontaminiert. Das macht eine spezielle Reinigung mit Säure und Nachspülen mit Aqua bidest. erforderlich.

3. Stahlkanüle

   Bringt man die Kanüle in eine 10 mmol HCl-Lösung ein, so ist zwar nach einer halben Stunde noch kein Mangan nachweisbar, doch nach 24 Stunden ist Mangan in der Lösung vorhanden. Es scheint zwar unwahrscheinlich, daß es durch die Kanüle zu einer Mangankontamination der Probe kommt, doch ist dies nicht völlig auszuschließen.

   Eine Abnahme mit einer Kunststoffbraunüle ist aus zwei Gründen nicht vorgenommen worden: Erstens befindet sich in dem Kunststoffschlauch der Braunüle

ebenfalls eine Stahlkanüle, die zwar bei der Blutabnahme herausgezogen wird, doch kann vorher Mangan durch Abrieb an die Innenseite des Schlauches abgegeben worden sein, so daß auf diese Art und Weise eine Kontamination hervorgerufen werden kann. Zum zweiten ist die Belastung der Patienten bei der Blutabnahme mit einer Braunüle größer als bei Abnahme mit einer Stahlkanüle.

Abschließend sei noch einmal betont, daß es nicht ausreicht, nur neue Chargen von Reagenzien und Laborgegenständen zu überprüfen. Auch bereits kontrollierte Chargen müssen in gewissen Abständen auf eine zwischenzeitliche Kontamination untersucht werden.

4.3. Matrix

Die Ausschaltung der durch die biologische Matrix hervorgerufenen Störungen ist eine unabdingbare Voraussetzung für die zuverlässige Analyse. Dazu wird zusätzlich zur Untergrundkompensation oft ein Aufschlußverfahren (Naßveraschung, Druckaufschluß, Tieftemperaturveraschung) und manchmal noch ein Extraktionsverfahren angewendet. Die Aufschlußverfahren sind häufig sehr störanfällig und zeitintensiv. In dieser Arbeit wird auf ein Aufschluß- und Extraktionsverfahren verzichtet. Die Matrix wird bei den Bleimessungen durch das Lumatom^{R} homogenisiert und dann verascht; bei den Manganbestimmungen verascht man ohne Aufbereitung der Probe bei 490 ^{o}C und entfernt die Rußpartikel durch hohen Carriergasstrom.

Die Zeit, die man durch Verzicht auf Aufschlußverfahren einspart, muß man bei der Analyse an anderer Stelle wieder aufwenden: Jede einzelne Serum- oder Blutprobe muß sehr langsam getrocknet werden, um ein Überkochen zu vermeiden. Außerdem ist in der Atomisierungsphase immer noch ein gewisser unspezifischer Untergrund vorhanden, der eine Peakdepression hervorruft und daher eine Vergleichsmessung mit einem wässrigen Standard unmöglich acht. Daher wird für jede Blut- oder Serumprobe eine Standardadditionsgerade erstellt.
Diese Standardadditionsmethode hat den Vorteil, daß hier die Eichung durch aufgestockte Proben gleicher Matrix erfolgt. Allerdings beträgt der Zeitaufwand 25 Minuten für eine Bleimessung und 40 Minuten für eine Manganmessung.
Die Methode der Direkteingabe hat noch einen wesentlichen Vorteil: Durch Aufschluß und Extraktion besteht die Möglichkeit einer zusätzlichen Kontamination und auch die Gefahr von Verlusten des zu bestimmenden Elements. Diese Fehlerquellen sind bei der Direkteingabe ausgeschaltet.

4.4. Gerät

Die zu dem Gerät gehörende Bedienungsanleitung gibt in einigen wichtigen Punkten falsche Informationen. So ist das Probevolumen für die cup-type Küvette mit 5o µl zu hoch angesetzt. Es hat sich gezeigt, daß allenfalls 30 µl Probevolumen eingesetzt werden können. Außerdem sind die empfohlenen Trocknungsprogramme für Blut- und Serumproben völlig unrealistisch. Die Proben würden bei dieser Programmeinstellung sicherlich verspritzen und die Werte wären nicht reproduzierbar.

Ein großer Nachteil des Gerätes ist der Steuerungsblock für die Temperatur- und Gaseinstellung: Es ist nicht möglich, die Aufheizungsgeschwindigkeit in der dry-phase in den verschiedenen Temperaturbereichen unterschiedlich einzustellen. Man muß also während des Trocknungsvorgangs von Hand die Aufheizungsgeschwindigkeit verändern. Ähnliches gilt für die Gaseinstellung: Einen Gas-Stop für das Carriergas in der Atomisierungsphase kann man nicht einstellen, daher muß man den Carriergasstrom ebenfalls von Hand regulieren. Dies macht ohnehin eine ständige Anwesenheit am Gerät während des Messvorganges erforderlich, so daß auch eine automatische Probeneingabe keine Zeitersparnis bringen würde. Wegen dieser erforderlichen dauernden Anwesenheit am Gerät liegt die aufzuwendende Zeit für jede Probe mit 25 Minuten für Blei und 40 Minuten für Mangan sehr hoch.

Die Angaben zur Untergrundkompensation in der Bedienungsanleitung sind nicht anwendbar. Es wird behauptet, daß der Untergrund bis zu einer Konzentration- ($\hat{=}$ Untergrund) anzeige von 80 noch voll kompensiert wird. Das ist aber nicht der Fall. Der Bereich, in dem der Untergrund kompensiert wird, liegt deutlich unter 80. In diesem Bereich wird der Untergrund allerdings zuverlässig kompensiert, so daß die leichten Matrixrückstände bei der Blei- und Manganmessung nicht verfälschend wirksam werden. Auf der anderen Seite kommt es durch den Untergrund zu einer Peak-Depression, die besonders bei der Bleimessung wirksam wird. Wie oben aufgeführt, macht dies dann die Erstellung einer Standardadditionsgerade erforderlich.

Die Wartung des Gerätes, insbesondere das Wechseln der Konus und Küvetten, ist problemlos. In regelmäßigen Abständen sollten Dichtungen und Schläuche der Gas- und Wasserzuleitungen überprüft werden.

4.5. Wiederfindung, Präzision und Vergleichsmessungen in einem anderen Labor

Die Wiederfindungsberechnungen an Hand der Standardadditionsgeraden ergeben sehr gute Ergebnisse: 98 %, 101 % und 100 % bei Blei sowie 98,5 %, 100 % und 101 % bei Mangan.

Die Präzisionskontrolle liefert bei den kleinen Stichprobenumfängen (n= 6 bei Blei, n= 4 bei Mangan) ausreichende Werte. Für die Bleimessungen beträgt der Variationskoeffizient V_k 15 %; für die Manganmessungen ist der Variationskoeffizient V_k = 10,9 %.

Einige Blutproben sind vergleichend in einem anderen Labor mit der folgenden Methode analysiert worden: 200 µl Vollblut wurden mit 200 µl Innerem Standard und 400 µl 1,5 mol HNO_3 versetzt. Anschließend wurde die so aufbereitete Probe 30 sec geschüttelt und dann bei 4000 U/min zentrifugiert. Die Bleikonzentration wurde im AAS-Gerät Perkin Elmer 5000 mit dem Graphitrohrofen HGA 500 bestimmt. Die Bleikonzentration des Vollbluts wird dann durch eine Standardadditionsgeraden ermittelt.

Wegen der völlig anderen Probenaufbereitung und des anderen AAS-Gerätes ist eine solche Vergleichsmessung aussagekräftig, obwohl beiden Methoden das Grundprinzip der Atomabsorption gemeinsam ist.

Laufende Nummer	Diabetesinstitut Blutbleikonzentration in µg/l	Vergleichslabor Blutbleikonzentration in µg/l
1	87	72
2	81	58
3	87	70
4	87	60
5	132	105
6	143	149
7	119	120
8	57	56
9	89	70
10	224	251
11	145	95
12	64	104
13	49	66
14	140	157
15	64	56
16	112	107
17	84	77
18	80	64
19	131	117
20	63	40
21	59	47

Tabelle 18: Ergebnisse der Vergleichsmessungen für Blei

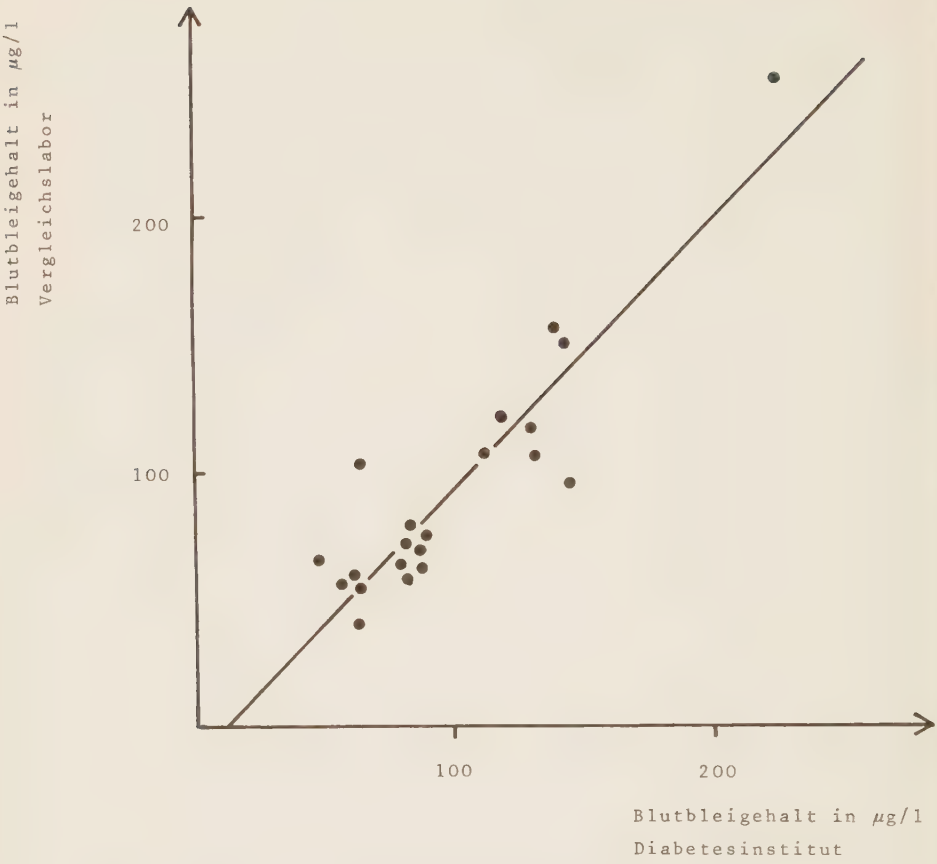


Abbildung 18: Der Blutbleigehalt von im Diabetesinstitut und in einem Vergleichslabor analysiertem Blut ist gegeneinander aufgetragen.

Korrelationskoeffizient k = 0,907
Geradengleichung y = 1,05x – 12,1 µg/l

In Abbildung 18 sind auf der Abszisse die im Diabetesinstitut gemessenen Werte und auf der Ordinate die im Vergleichslabor gemessenen aufgetragen. Als empirischer Korrelationskoeffizient der Punktwolke ergibt sich

$$k = 0{,}907$$

Die Regressionsgerade durch die Punktwolke ($y = ax + b$) lautet

$$y = 1{,}05x - 12{,}1\ \mu g/l$$

Im Idealfall wäre $a = 1$ und $b = o$; doch die ermittelte Steigung $a = 1{,}05$ und der y - Achsenabschnitt $b = -12{,}1\ \mu g/l$ zeigen auch noch eine gute Übereinstimmung der Messungen.

4.6. Vergleich mit Literaturwerten

Da in der Spurenelementanalytik von verschiedenen Laboratorien Normalwerte in biologischen Matrices für dasselbe Element gemessen worden sind, die sich um mehr als eine Zehnerpotenz unterscheiden (25,28), ist ein kritischer Vergleich der eigenen Ergebnisse mit Literaturwerten angebracht, um grobe systematische Fehler zu erkennen.

In dieser Arbeit beträgt der Mittelwert der Blutbleigehalte bei männlichen Probanden 95,6 µg/l und bei weiblichen Probanden 83,6 µg/l. Stöppler et al. haben bei einem nicht näher beschriebenen unbelasteten Kollektiv Werte von 128 µg/l für Männer und 104 µg/l für Frauen gemessen (16). Brockhaus et al. haben den Blutbleigehalt von 50 jährigen Männern aus Köln bestimmt und als geometrischen Mittelwert 128 µg/l erhalten (17). Die Werte in diesen Arbeiten liegen somit bei den Männern um 30 % und bei den Frauen 20 % höher als die eigenen Werte. Alle von Brockhaus et al. untersuchten Probanden leben in der durch Verkehr und Industrie stark belasteten Großstadt Köln. Außerdem ist ein Teil der Untersuchten auch am Arbeitsplatz bleiexponiert. Das Kollektiv ist demnach insgesamt stärker belastet als das in dieser Arbeit untersuchte. Diese unterschiedliche Zusammensetzung der Kollektive erklärt auch die Unterschiede bei den Normalwerten, die in der Größenordnung durchaus übereinstimmen.

Eine bessere Übereinstimmung der Bleiwerte ergibt der Vergleich mit der von Tola und Nordman bei einem Kollektiv von 135 männlichen Nichtrauchern gemessenen Blutbleikonzentration von 102 µg/l (18).

Autor	Jahr der Publikation	Mittelwert der Mangan-konzentration in µg/l	Methode	Quelle
Fernandez	1963	0,63	AAS	19
Cotzias et al.	1966	0,59	NAA	20
Kanabrocki et al.	1967	13	NAA	21
Mahoney et al.	1969	24	AAS-f	22
Ross and Gonzalez	1974	21,8	AAS	23
Grafflage et al	1974	1,94	AAS	24
Versieck et al	1974	0,57	NAA	25
D´Amico and Klawans	1976	1,02	AAS	26
Pleban and Pearson	1979	1,82	AAS	27
Halls and Fell	1980	0,63	AAS	28
eigene Arbeit	1981	0,91	AAS	

Tabelle 19: Zusammenstellung von Arbeiten, in denen die Serummangankonzentration bestimmt worden ist.

AAS flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie

AAS-f Atomabsorptionsspektroskopie

NAA Neutronenaktivierungsanalyse

Der Vergleich der im Serum gemessenen Mangankonzentrationen zeigt erhebliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Autoren (max: 21,8 µg/l min: 0,57 g/l). Es bilden sich dabei zwei Gruppen von Arbeiten heraus: In der ersten werden mittlere Mangankonzentrationen im Serum von über 10 µg/l (21; 22; 23) und in der zweiten Werte unter 2 µg/l (19; 20; 23-28) beschrieben. Alle neueren Arbeiten sind der zweiten Gruppe zuzuordnen. Sehr wahrscheinlich sind diese niedrigeren Werte richtiger als die höheren. Die Messung von sehr hohen Mangankonzentrationen (21; 22; 23) kann durch Kontamination erklärt werden. Eine Beurteilung, welche Werte innerhalb der zweiten Gruppe (Mangankonzentrationen unter 2 µg/l) richtig sind, wäre zu spekulativ und wurde daher nicht vorgenommen.
Die in dieser Arbeit gemessenen Serummangankonzentrationen von 0,95 µg/l für männliche und 0,88 µg/l für weibliche Probanden stimmen gut mit den neueren Literaturwerten überein.

Der große Unterschied zwischen den von verschiedenen Autoren gemessenen Serummangankonzentrationen demonstriert eindrucksvoll die Schwierigkeiten der Kontaminationsvermeidung und Analyse bei Spurenelementbestimmungen in biologischen Matrices.

4.7. Schlußfolgerung aus dem Ergebnis

Da der Bleispiegel bei den Diabetikern im Vergleich zu den Normalpersonen keine wesentlichen Unterschiede aufweist, erscheint ein Zusammenhang zwischen Diabetes und Blei eher unwahrscheinlich. Bemerkenswert ist der erhöhte Bleispiegel bei den schlecht eingestellten Altersdiabetikern, der deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant ist. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür wäre, daß schlecht eingestellter Diabetes als physische Belastung wirkt. Durch physische Belastung wird Blei aus den Körperdepots freigesetzt (3; 4).
Obwohl das Mangan eine wesentliche Rolle als Bestandteil von Metalloenzymen im Kohlenhydratstoffwechsel spielt, finden sich keine Unterschiede in der Serummangankonzentration zwischen Diabetikern und Normalpersonen.

5. Zusammenfassung

Es wird eine Methode zur Direktbestimmung von Blei im Vollblut und Mangan im Serum durch flammenlose Atomabsorptionsspektroskopie in einem klinischen Labor erarbeitet.
Das Vollblut wird für die Bleibestimmung mit Lumatom^{R} und Isopropanol aufbereitet. Die Mangan-messung im Serum erfolgt nach Verdünnung von Isopropanol und bidestilliertem Wasser. Die Analyse wird mit dem Gerät Hitachi 170-70 durchgeführt, das den Untergrund durch Anwendung des Zeeman-Effekts kompensiert. Als Eichverfahren dient die Standardadditionsmethode.
Mit Hilfe dieser Methode wird die Blutblei- und die Serummangankonzentration bei gut und schlecht eingestellten juvenilen Diabetikern (Typ I) und von Altersdiabetikern (Typ II) sowie Normalpersonen untersucht. Zwischen den fünf Kollektiven ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die durchschnittliche Blutbleikonzentration des Gesamtkollektivs beträgt bei den männlichen Probanden 95,6 μg/l, bei den weiblichen 83,6 μg/l. Der Mittelwert der Serummangankonzentration des Gesamtkollektivs beträgt bei den Männern 0,95 μg/l und den Frauen 0,88 μg/l. Diese Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

6. Literaturverzeichnis

1 Hammond, P.D. : Metabolism and Metabolic Action of Lead and other Heavy Metals
In: Oehme, F.W. (Ed.) : Toxicity of Heavy Metals in the Environment, Part I; Dekker, New York (1976); 87-99

2 Wellhöner, H.-H. : Pharmakologie und Toxikologie; 2.Aufl.; Springer Verlag,Berlin - Heidelberg - New York (1976)

3 Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. : Pharmakologie und Toxikologie; 2.Aufl.; Wissenschaftsverlag, Mannheim - Wien - Zürich (1977)

4 Oehme, F.W. : Mechanisms of Heavy Metal Inorganic Toxicities
In: Oehme, F.W. (Ed.) : Toxicity of Heavy Metals in the Environment, Part I; Dekker, New York (1976); 69-85

5 Green, V.A., Wise, G.W., Callenbach, J.C. : Lead Poisoning
In: Oehme, F.W. (Ed.) : Toxicity of Heavy Metals in the Environment, Part I; Dekker, New York (1976); 123-141

6 WHO Publication : Environmental Health Criteria for Lead; WHO Genf (1977)

7 National Academy of Science Washington : Medical and Biological Effects of Environmental Pollution - Manganese; Washington DC (1973)

8 Shamberger, R.J. : Beneficial Effects of Trace Elements
In : Oehme, F.W. (Ed.) : Toxicity of Heavy Metals in the Environment, Part II; Dekker, New York (1979)

9 Hancock, R.G.V., Evans, D.J.R., Fritze, K. : Manganese Proteins in Blood Plasma
Biochim. Biophys. Acta, 320 (1973); 486-493

10 Mumenthaler, M. : Neurologie
5. Aufl.; Thieme Verlag, Stuttgart (1976)

11 Harper, H.A., Löffler G., Petrides, P.E., Weiss, L. : Physiologische Chemie
1. Aufl.; Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1975)

12 Kirchgessner, M. und Heiseke, D. : Arginase-Aktivität in der Leber wachsender Ratten bei Mangan-Mangel
Int. Z. Vitam. Ern. Forsch., 48 (1978); 75-78

13 Hermansen, K. and Iversen,J. : Dual Action of Mn^{++} upon the Secretion of Insulin and Glucagon from the Isolated, Perfused Canine Pancreas
Diabetologia, 15 (1978); 475-479

14 Buttgereit, G. : Atomabsorptions-, Flammenemissions- und Atomfluoreszensspektroskopie
In: Korte, F. (Hrgb.) : Methodicum Chimicum, Band 1; Thieme Verlag Stuttgart (1973); 736-752

15 Tölg, G. : Grundlagen der Spurenanalyse
In: Korte, F. (Hrgb.) : Methodicum Chimicum, Band 1; Thieme Verlag Stuttgart (1973); 724-736

16 Brockhaus, A., Freier, I., Ewers, U., Baginski, B., Krämer, U., Dolgner, R. : Epidemologische Untersuchungen zur ökologischen Bleibelastung von männlichen Großstadtbewohnern in Nordwestdeutschland
Int. Arch. Occup. Environ. Health, 46 (1980); 59-70

17 Stoeppler, M., Backhaus, F., Dahl, R., Dumont, M., Hagedorn-Götz, H., Hilpert, K., Klahre, P., Rützel, H., Valenta, P., Nürnberg, W. : Zur Blei- und Cadmiumanalytik in biologischen Matrices
In : Tagungsberichte Internationales Symposium Neueste Erkenntnisse in der Beurteilung der gesundheitlichen Folgen der Umweltverschmutzung
Published by the Commission of the European Communities Directorate General Scientific and Technical Information and Information Management, Luxembourg (1975); 2231-2245

18 Tola, S. and Nordman, C.H. : Smoking and Blood Lead Concentrations in Lead-Exposed Workers and an Unexposed Population
Environ. Res., 13 (1977); 250-255

19 Fernandez, A.A., Sobel, C., Jacobs, S.L. : Sensitive Method for the Determination of Submicrogram Quantities of Manganese and Its Application to Human Serum
Anal. Chem., 35 (1963); 1721-1724

20 Cotzias, G.C., Miller, S.T., Edwards, J. : Neutron activation analysis: The stability of manganese concentrations in human blood and serum
J. Lab. & Clin. Med., 67 (1966); 836-849

21 Kanabrocki, E.L., Case, L.F., Graham, L., Fields, T., Miller, E.B., Oester, Y.T., Kaplan, E. : Non Dialyzable Manganese and Copper Levels in Serum of Patients with Various Deseases
J. Nucl. Med., 8 (1967); 166-172

22 Mahoney, J.P., Sargent, K., Greland, M., Small, W. : Studies on Manganese: Determination in Serum by Atomic Absorption Spectrophotometry
Clin. C-em., 15 (1969); 312-322

23 Ross, R.T. and Gonzalez, J.G. : The Direct Determination of Trace Quantities of Manganese in Blood and Serum Samples Using Selective Volatilization and Graphite Tube Reservoir Atomic Absorption Spectrophotometry
Bull. Environ. Contam. & Toxic., 12 (1974); 470-474

24 Grafflage, B., Buttgereit, G., Kübler, W., Mertens, H.-M. : Die Messung der Spurenelemente Chrom und Mangan im Serum mittels flammloser Atomabsorption
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem., 12 (1974); 287-293

25 Versieck, J., Barbier, F., Speecke, A., Hoste, J. : Normal Manganese Concentrations in Human Serum
Acta Endocrinol., 76 (1974); 783-788

26 D'Amico, D., Klawans, H.L. : Direct Microdetermination of Manganese in Normal Serum and Cerebrospinal Fluid by Flameless Atomic Absorption Spectrophotometry
Anal. Chem., 48 (1976); 1469-1472

27 Pleaban, P.A. and Pearson, K.H. : Determination of Manganese in Whole Blood and Serum
Clin. Chem., 25 (1979); 1915-1918

28 Halls, D.J. and Fell, G.S. : The Determination of Manganese in Urine and Serum
In: Brätter, P. and Schramel, P. (Ed.) : Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology; de Gruyter Verlag, Berlin - New York (1980); 265-272

29 Leach, R.M. and Lilburn, M.S. : Manganese Metabolism and Its Function
Wld. Rev. Nutr. Diet., 32 (1978); 123-134

D A N K S A G U N G

Herrn Prof. Dr. Reinauer danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und besonders für sein Interesse und seine Betreuung während der Arbeit.

Herrn Jerman danke ich für die Durchführung der Vergleichsmessungen im Hygiene Institut der Universität Düsseldorf.

Herrn Schäfer vom Institut für Biomathematik und Medizinische Statistik möchte ich für seine Beratung in biomathematischen Fragen danken.

L E B E N S L A U F

28.1.1957	als Sohn des Ingenieurs Horst Fleischhauer und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Napp in Essen geboren
1963 - 1966	Katholische Volksschule Rheinkamp Eick-West
1966 - 1975	Städtisches Gymnasium Rheinkamp
1975	Allgemeine Hochschulreife
WS 1975/76	Ingenieurstudium an der RWTH Aachen
SS 1976	Immatrikulation an der Universität Düsseldorf zum Studium der Humanmedizin
März 1978	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
März 1979	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1981	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
ab April 1981	Praktisches Jahr an der Universität Düsseldorf

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen